

125

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 199 40 765.7

Anmeldetag: 27. August 1999

Anmelder/Inhaber: BASF Aktiengesellschaft, Ludwigshafen/DE

Bezeichnung: Corynebacterium Glutamicum-Gene die Proteine codieren, die an der Membransynthese und am Membrantransport beteiligt sind

IPC: C 07 K, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 4. Juli 2002
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
im Auftrag

A handwritten signature in black ink, appearing to read "W. Schäfer", is placed here.

CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM-GENE, DIE PROTEINE CODIEREN, DIE AN DER MEMBRANSYNTHESE UND AM MEMBRANTRANSPORT BETEILIGT SIND



5 Hintergrund der Erfindung

Bestimmte Produkte und Nebenprodukte von natürlich-vorkommenden Stoffwechselprozessen in Zellen werden in vielen Industriezweigen verwendet, einschließlich der Nahrungsmittel-, Futtermittel-, Kosmetik- und pharmazeutischen Industrie. Diese Moleküle, die gemeinsam als "Feinchemikalien" bezeichnet werden, umfassen organische Säuren; sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Nukleotide und Nukleoside, Lipide und Fettsäuren, Diole, Kohlehydrate, aromatische Verbindungen, Vitamine und Co-faktoren sowie Enzyme. Ihre Produktion erfolgt am besten mittels Anzucht von Bakterien im Großmaßstab, die entwickelt wurden, um große Mengen von einem oder mehreren Molekülen zu produzieren und sezernieren. Ein für diesen Zweck besonders geeigneter Organismus ist *Corynebacterium glutamicum*, ein gram-positives, nicht-pathogenes Bakterium. Über Stammselektion ist eine Reihe von Mutantenstämmen entwickelt worden, die ein Sortiment wünschenswerter Verbindungen produzieren. Die Auswahl von Stämmen, die hinsichtlich der Produktion eines bestimmten Moleküls verbessert sind, ist jedoch ein zeitaufwendiges und schwieriges Verfahren.

25

Zusammenfassung der Erfindung

Diese Erfindung stellt neuartige Nukleinsäuremoleküle bereit, die sich zur Identifizierung oder Klassifizierung von *Corynebacterium glutamicum* oder verwandten Bakterienarten verwenden lassen. *C. glutamicum* ist ein gram-positives, aerobes Bakterium, das in der Industrie für die Produktion im Großmaßstab einer Reihe von Feinchemikalien, und auch zum Abbau von Kohlenwasserstoffen (bspw. beim Überlaufen von Rohöl) und zur Oxidation von Terpenoiden gemeinhin verwendet wird. Die Nukleinsäuremoleküle können daher zum Identifizieren von Mikroorganismen eingesetzt werden, die sich zur Produktion von Feinchemikalien, bspw. durch Fermentationsverfahren, verwenden lassen. *C. glutamicum* selbst ist zwar nicht-pathogen, jedoch ist es mit anderen *Corynebacterium*-Arten, wie *Corynebacterium diphtheriae* (dem Erreger der Diphtherie) verwandt, die bedeutende Pathogene beim Menschen sind. Die Fähigkeit, das Vorhandensein von *Corynebacterium*-Arten zu identifizieren, kann daher auch eine signifikante klinische Bedeutung haben, z.B. bei diagnostischen Anwendungen. Diese Nukleinsäuremoleküle können zudem als Bezugspunkte zur Kartierung des *C. glutamicum*-Genoms oder von Genomen verwandter Organismen dienen.

4

Diese neuen Nukleinsäuremoleküle codieren Proteine, die hier als Membrankonstruktions- und Membrantransport-(MCT)-Proteine bezeichnet werden. Diese MCT-Proteine können bspw. eine Funktion ausüben, die am Stoffwechsel (z.B. Biosynthese oder Abbau) von Verbindungen beteiligt ist, die für die Membranbiosynthese notwendig sind, oder den Membrantransport von einer oder mehreren Verbindungen in die Zelle oder aus der Zelle unterstützen. Aufgrund der Verfügbarkeit von Klonierungsvektoren zur Verwendung in *Corynebacterium glutamicum*, wie bspw. offenbart in Sinskey et al., US-Patent Nr. 4 649 119, und Techniken zur genetischen Manipulation von *C. glutamicum* und den verwandten *Brevibacterium*-Arten (z.B. *Lactofermentum*) Yoshihama et al., J. Bacteriol. 162 (1985) 591-597; Katsumata et al., J. Bacteriol. 159 (1984) 306-311; und Santamaria et al. J. Gen. Microbiol. 130 (1984) 2237-2246), lassen sich die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle zur genetischen Manipulation dieses Organismus verwenden, um es als Produzenten von einer oder mehreren Feinchemikalien besser und effizienter zu machen. Die verbesserte Produktion oder Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie kann auf einer direkten Wirkung der Manipulation eines erfindungsgemäßen Gens oder auf einer indirekten Wirkung dieser Manipulation beruhen.

Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die die Veränderung eines erfindungsgemäßen MCT-Proteins die Ausbeute, Produktion und/oder die Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie aus einem *C. glutamicum*-Stamm, der ein solches verändertes Protein enthält, direkt beeinflussen kann. Diese MCT-Proteine, die am Export der Feinchemikalien-Moleküle aus der Zelle beteiligt sind, können eine größere Anzahl oder höhere Aktivität aufweisen, so daß größere Mengen dieser Verbindungen in das extrazelluläre Medium sezerniert werden, aus dem sie leichter gewonnen werden. Diese MCT-Proteine, die am Import der Nährstoffe beteiligt sind, die für die Biosynthese von einer oder mehreren Feinchemikalien (z.B. Phosphat, Sulfat, Stickstoffverbindungen usw.) notwendig sind, können eine größere Anzahl oder höhere Aktivität aufweisen, so daß diese Vorstufen, Cofaktoren oder Zwischenverbindungen in der Zelle in höherer Konzentration vorliegen. Zudem sind Fettsäuren und Lipide selbst wünschenswerte Feinchemikalien; durch Optimieren der Aktivität oder Vergrößern der Anzahl von einem oder mehreren erfindungsgemäßen MCT-Proteinen, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Beeinträchtigen der Aktivität von einem oder mehreren MCT-Proteinen, die am Abbau dieser Verbindungen beteiligt sind, kann man die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Fettsäuren und Lipidmolekülen aus *C. glutamicum* steigern.

Die Mutagenese von einem oder mehreren erfindungsgemäßen MCT-Genen kann auch MCT-Proteine mit veränderten Aktivitäten hervorbringen, die die Produktion von einer oder mehreren gewünschten Feinchemikalien aus *C. glutamicum* indirekt beeinträchtigen. Bspw. können erfindungsgemäße MCT-Proteine, die am Export von Abfallprodukten beteiligt sind, eine größere Zahl oder höhere Aktivität aufweisen, so daß die normalen Stoffwechselabfälle der Zelle (aufgrund der Überproduktion der gewünschten Feinchemikalie möglicherweise in höherer Quantität) effizient exportiert werden, bevor sie die Nukleotide und Proteine in der Zelle beschädigen können (was die Lebensfähigkeit der Zelle herabsetzen würde) oder mit den Feinchemikalien-Biosynthesewegen wechselwirken können (was die Ausbeute, Produktion oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Feinchemikalien senken würde). Die relativ großen intrazellulären Mengen der gewünschten Feinchemikalie können selbst für die Zelle toxisch sein, bspw. kann man durch Vergrößern der Anzahl an Transportern, die diese Verbindungen aus der Zelle exportieren können, die Lebensfähigkeit der Zelle in Kultur steigern, was wiederum bewirkt, daß eine größere Anzahl Zellen in der Kultur die gewünschte Feinchemikalie produziert. Die erfindungsgemäßen MCT-Proteine können auch so manipuliert werden, daß die relativen Mengen der unterschiedlichen Lipid- und Fettsäuremoleküle produziert werden. Dies kann eine erhebliche Auswirkung auf die Lipidzusammensetzung der Zellmembran haben. Da jeder Lipidtyp unterschiedliche physikalische Eigenschaften aufweist, kann eine Veränderung der Lipidzusammensetzung einer Membran die Membranfluidität signifikant verändern. Änderungen der Membranfluidität können den Transport der Moleküle über die Membran sowie die Integrität der Zelle beeinflussen, was jeweils eine erhebliche Auswirkung auf die Produktion von Feinchemikalien aus *C. glutamicum* in großangelegten Fermenterkulturen hat.

Die Erfindung stellt neue Nukleinsäuremoleküle bereit, die Proteine codieren, die hier als MCT-Proteine bezeichnet werden und bspw. am Metabolismus von Verbindungen, die für den Aufbau der Zellmembranen in *C. glutamicum* notwendig sind, oder am Transport von Molekülen über diese Membranen beteiligt sind. Das MCT-Protein ist in einer bevorzugten Ausführungsform am Metabolismus von Verbindungen, die für den Aufbau der Zellmembranen in *C. glutamicum* nötig sind, oder am Transport von Molekülen über diese Membranen beteiligt. Beispiele für diese Proteine umfassen solche, die von den in Tabelle 1 angegebenen Genen codiert werden.

Ein Aspekt der Erfindung betrifft folglich isolierte Nukleinsäuremoleküle (bspw. cDNAs), umfassend eine Nukleotidsequenz, die ein MCT-Protein oder biologisch aktive Abschnitte davon codiert, sowie Nukleinsäurefragmente, die sich als Primer oder Hybridisie-

rungssonden zum Nachweisen oder zur Amplifikation von MCT-codierender Nukleinsäure (bspw. DNA oder mRNA) eignen. Bei besonders bevorzugten Ausführungsformen umfaßt das isolierte Nukleinsäuremolekül eine der in Anhang A aufgeführten Nukleotidsequenzen oder 5 den codierenden Bereich oder ein Komplement davon von einer dieser Nukleotidsequenzen. In anderen besonders bevorzugten Ausführungsformen umfaßt das erfindungsgemäße isolierte Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz, die an eine in Anhang A angegebene Nukleotidsequenz oder einen Abschnitt davon hybridisiert oder 10 mindestens zu etwa 50%, vorzugsweise mindestens zu etwa 60%, stärker bevorzugt mindestens etwa 70%, 80% oder 90% und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 95%, 96%, 97%, 98%, 99% oder noch homologer dazu ist. In anderen bevorzugten Ausführungsformen codiert das isolierte Nukleinsäuremolekül eine der in Anhang B 15 aufgeführten Aminosäuresequenzen. Die bevorzugten erfindungsgemäßen MCT-Proteine besitzen ebenfalls vorzugsweise mindestens eine der hier beschriebenen MCT-Aktivitäten.

Bei einer weiteren Ausführungsform codiert das isolierte Nuklein- 20 säuremolekül ein Protein oder einen Abschnitt davon, wobei das Protein oder sein Abschnitt eine Aminosäuresequenz enthält, die zu einer Aminosäuresequenz in Anhang B hinreichend homolog ist, bspw. zu einer Aminosäuresequenz in Anhang B derart hinreichend homolog ist, daß das Protein oder sein Abschnitt eine MCT-Aktivi- 25 tät behält. Vorzugsweise kann das von dem Nukleinsäuremolekül codierte Protein oder der Abschnitt davon weiterhin die Fähigkeit behalten, am Metabolismus von Verbindungen teilzunehmen, die für den Aufbau der Zellmembranen von *C. glutamicum* oder den Transport von Molekülen über diese Membranen nötig sind. Bei einer Ausfüh- 30 rungsform ist das von dem Nukleinsäuremolekül codierte Protein mindestens etwa 50%, vorzugsweise mindestens etwa 60% und stärker bevorzugt mindestens etwa 70%, 80% oder 90% und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% oder noch ho- 35 mologer zu einer Aminosäuresequenz in Anhang B (bspw. eine vollständige Aminosäuresequenz, ausgewählt aus den in Anhang B ge- nannten Sequenzen). Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungs- form ist das Protein ein *C. glutamicum*-Vollängenprotein, das zu einer vollständigen Aminosäuresequenz in Anhang B (die von dem in Anhang A gezeigten offenen Leseraster codiert wird) im wesentli- 40 chen homolog ist.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform stammt das iso- lierte Nukleinsäuremolekül aus *C. glutamicum* und codiert ein Protein (z.B. ein MCT-Fusionsprotein), das eine zu einer der Amino- 45 säuresequenzen in Anhang B zumindest etwa 50% oder stärker homo- loge biologisch aktive Domäne umfaßt, und am Metabolismus von Verbindungen, die für den Aufbau der Zellmembran nötig sind, und

am Transport von Molekülen über diese Membran beteiligt ist, oder eine oder mehrere der in Tabelle 1 angegebenen Aktivitäten aufweist und enthält ebenfalls heterologe Nukleinsäuresequenzen, die ein heterologes Polypeptid oder regulatorische Bereiche codieren.

5

Bei einer weiteren Ausführungsform ist das isolierte Nukleinsäuremolekül mindestens 15 Nukleotide lang und hybridisiert unter stringenten Bedingungen an ein Nukleinsäuremolekül, das eine Nukleotidsequenz aus Anhang A umfaßt. Das isolierte Nukleinsäuremolekül entspricht vorzugsweise einem natürlich vorkommenden Nukleinsäuremolekül. Die isolierte Nukleinsäure codiert stärker bevorzugt ein natürlich vorkommendes *C. glutamicum*-MCT-Protein oder einen biologisch aktiven Abschnitt davon.

15 Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Vektoren, bspw. rekombinante Expressionsvektoren, die die erfindungsgemäß Nukleinsäuremoleküle enthalten, und Wirtszellen, in die diese Vektoren eingebracht worden sind. Bei einer Ausführungsform wird zur Herstellung eines MCT-Proteins eine Wirtszelle verwendet, die 20 in einem geeigneten Medium gezüchtet wird. Das MCT-Protein kann dann aus dem Medium oder der Wirtszelle isoliert werden.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft einen genetisch veränderten Mikroorganismus, bei dem ein MCT-Gen eingebracht oder verändert worden ist. Das Genom des Mikroorganismus ist bei einer Ausführungsform durch Einbringen eines erfindungsgemäß Nukleinsäuremoleküls verändert worden, das die MCT-Wildtyp- oder die mu4tierte MCT-Sequenz als Transgen codiert. Bei einer anderen Ausführungsform ist ein endogenes MCT-Gen im Genom des Mikroorganismus durch homologe Rekombination mit einem veränderten MCT-Gen verändert, z.B. funktionell disruptiert, worden. Der Mikroorganismus gehört bei einer bevorzugten Ausführungsform zur Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium*, wobei *Corynebacterium glutamicum* besonders bevorzugt ist. Der Mikroorganismus wird in einer bevorzugten Ausführungsform auch zur Herstellung einer gewünschten Verbindung, wie einer Aminosäure, besonders bevorzugt Lysin, verwendet.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein isoliertes MCT-40 Protein oder einen Abschnitt, bspw. einen biologisch aktiven Abschnitt davon. Das isolierte MCT-Protein oder sein Abschnitt kann in einer bevorzugten Ausführungsform am Metabolismus von Verbindungen, die für den Aufbau der Zellmembranen in *C. glutamicum* notwendig sind, oder am Transport von Molekülen über die Membranen beteiligt sein. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das isolierte MCT-Protein oder ein Abschnitt davon hinreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz von Anhang B, so daß

das Protein oder sein Abschnitt weiterhin am Metabolismus von Verbindungen, die für den Aufbau der Zellmembranen in *C. glutamicum* notwendig sind, oder am Transport von Molekülen über die Membranen beteiligt sein kann.

5

Die Erfindung betrifft zudem ein isoliertes MCT-Proteinpräparat.

Das MCT-Protein umfaßt bei bevorzugten Ausführungsformen eine Aminosäuresequenz aus Anhang B. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein isoliertes Vollängen-

10 protein, das zu einer vollständigen Aminosäuresequenz aus Anhang B (welche von einem offenen Leseraster in Anhang A codiert wird) im wesentlichen homolog ist. Bei einer weiteren Ausführungsform ist das Protein mindestens zu etwa 50%, vorzugsweise mindestens

zu etwa 60%, stärker bevorzugt mindestens etwa 70%, 80% oder 90% 15 und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 95%, 96%, 97%, 98%, oder 99% oder noch homologer zu einer vollständigen Aminosäure-

sequenz aus Anhang B. Das isolierte MCT-Protein umfaßt bei anderen Ausführungsformen eine Aminosäuresequenz, die zu mindestens etwa 50% oder mehr zu einer der Aminosäuresequenzen aus Anhang B 20 homolog ist und am Metabolismus von Verbindungen, die für den Aufbau der Zellmembranen in *C. glutamicum* notwendig sind, oder am Transport von Molekülen über die Membranen beteiligt sein kann, oder eine oder mehrere der in Tabelle 1 angegebenen Aktivitäten hat.

25

Das isolierte MCT-Protein kann alternativ eine Aminosäuresequenz umfassen, die von einer Nukleotidsequenz codiert wird, welche mit einer Nukleotidsequenz aus Anhang B, bspw. unter stringenten Bedingungen, hybridisiert oder mindestens zu etwa 50%, vorzugsweise 30 mindestens zu etwa 60%, stärker bevorzugt mindestens etwa 70%, 80% oder 90% und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% oder noch homologer dazu ist. Bevorzugte Formen der MCT-Proteine haben ebenfalls vorzugsweise eine oder mehrere der hier beschriebenen MCT-Bioaktivitäten.

35

Das MCT-Polypeptid oder ein biologisch aktiver Abschnitt davon kann mit einem Nicht-MCT-Polypeptid funktionsfähig verbunden werden, damit ein Fusionsprotein entsteht. Dieses Fusionsprotein hat bei bevorzugten Ausführungsformen eine andere Aktivität als das 40 MCT-Protein allein und ergibt bei anderen bevorzugten Ausführungsformen erhöhte Ausbeuten, eine erhöhte Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Feinchemikalie aus *C. glutamicum*. Die Integration dieses Fusionsproteins in eine Wirtszelle moduliert bei besonders bevorzugten Ausführungsformen die 45 Produktion einer gewünschten Verbindung von der Zelle.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer Feinchemikalie. Das Verfahren sieht die Anzucht einer Zelle vor, die einen Vektor enthält, der die Expression eines erfindungsgemäßen MCT-Nukleinsäuremoleküls bewirkt, so daß 5 eine Feinchemikalie produziert wird. Dieses Verfahren umfaßt bei einer bevorzugten Ausführungsform zudem den Schritt der Gewinnung einer Zelle, die einen solchen Vektor enthält, wobei die Zelle mit einem Vektor transfiziert ist, der die Expression einer MCT-Nukleinsäure bewirkt. Dieses Verfahren umfaßt bei einer weiteren 10 bevorzugten Ausführungsform zudem den Schritt, bei dem die Feinchemikalie aus der Kultur gewonnen wird. Die Zelle gehört bei einer bevorzugten Ausführungsform zur Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* oder wird aus den in Tabelle 3 angegebenen Stämmen ausgewählt.

15

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Verfahren zur Modulation der Produktion eines Moleküls aus einem Mikroorganismus. Diese Verfahren umfassen das Zusammenbringen der Zelle mit einer Substanz, die die MCT-Proteinaktivität oder die MCT-Nukleinsäure-20 Expression moduliert, so daß eine zellassoziierte Aktivität verglichen mit der gleichen Aktivität bei Fehlen der Substanz verändert wird. Die Zelle wird bei einer bevorzugten Ausführungsform hinsichtlich eines oder mehrerer *C. glutamicum*-Stoffwechselwege für Zellmembrankomponenten oder hinsichtlich des Transports von 25 Verbindungen über die Membranen moduliert, so daß die Ausbeuten oder die Produktionsrate einer gewünschten Feinchemikalie durch diesen Mikroorganismus verbessert werden. Die Substanz, die die MCT-Proteinaktivität moduliert, stimuliert bspw. die MCT-Proteinaktivität oder die MCT-Nukleinsäure-Expression. Beispiele von 30 Substanzen, die die MCT-Proteinaktivität oder die MCT-Nukleinsäureexpression stimulieren, umfassen kleine Moleküle, aktive MCT-Proteine und Nukleinsäuren, die MCT-Proteine codieren und in die Zelle eingebracht worden sind. Beispiele von Substanzen, die die MCT-Aktivität oder -Expression hemmen, umfassen kleine Moleküle 35 und Antisense-MCT-Nukleinsäuremoleküle.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Verfahren zur Modulation der Ausbeuten einer gewünschten Verbindung aus einer Zelle, umfassend das Einbringen eines MCT-Wildtyp- oder -Mutantengens in 40 eine Zelle, das entweder auf einem gesonderten Plasmid bleibt oder in das Genom der Wirtszelle integriert wird. Die Integration in das Genom kann zufallsgemäß oder durch homologe Rekombination erfolgen, so daß das native Gen durch die integrierte Kopie ersetzt wird, was die Produktion der gewünschten Verbindung aus der 45 zu modulierenden Zelle hervorruft. Diese Ausbeuten sind bei einer bevorzugten Ausführungsform erhöht. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die Chemikalie eine Feinchemikalie, die

in einer besonders bevorzugten Ausführungsform eine Aminosäure ist. Diese Aminosäure ist in einer besonders bevorzugten Ausführungsform L-Lysin.

5 Eingehende Beschreibung der Erfindung

Die vorliegende Erfindung stellt MCT-Nukleinsäure- und -Proteinmoleküle bereit, die am Metabolismus von Verbindungen, die für den Aufbau der Zellmembranen in *C. glutamicum* notwendig sind, 10 oder am Transport von Molekülen über die Membranen beteiligt sein können. Die erfindungsgemäßen Moleküle lassen sich bei der Modulation der Produktion von Feinchemikalien von Mikroorganismen, wie *C. glutamicum*, verwenden, und zwar entweder direkt (z.B. wo die Überexpression oder Optimierung eines Fettsäurebiosynthese- 15 seproteins eine direkte Auswirkung auf die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der Fettsäure von modifiziertem *C. glutamicum* hat) oder durch eine mögliche indirekte Auswirkung, die trotzdem einen Anstieg der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der gewünschten Verbindung bewirkt (z.B. 20 wo die Modulation des Metabolismus der Zellmembrankomponenten Veränderungen der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion oder der Zusammensetzung der Zellmembran bewirkt, was wiederum die Produktion von einer oder mehreren Feinchemikalien beeinflusst). Die erfindungsgemäßen Aspekte werden nachstehend 25 weiter erläutert.

I. Feinchemikalien

Der Begriff "Feinchemikalie" ist im Fachgebiet bekannt und beinhaltet Moleküle, die von einem Organismus produziert werden und in verschiedenen Industriezweigen Anwendungen finden, wie bspw., 30 jedoch nicht beschränkt auf die pharmazeutische Industrie, die Landwirtschafts-, und Kosmetik-Industrie. Diese Verbindungen umfassen organische Säuren, wie Weinsäure, Itaconsäure und Diamino- 35 pimelinsäure, sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Purin- und Pyrimidinbasen, Nukleoside und Nukleotide (wie bspw. beschrieben in Kuninaka, A. (1996) Nucleotides and related compounds, S. 561-612, in Biotechnology Bd. 6, Rehm et al., Hrsg. VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten), Lipide, 40 gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (bspw. Arachidonsäure), Diole (bspw. Propandiol und Butandiol), Kohlenhydrate (bspw. Hyaluronsäure und Trehalose), aromatische Verbindungen (bspw. aromatische Amine, Vanillin und Indigo), Vitamine und Cofaktoren (wie beschrieben in Ullmann's Encyclopedia of Industrial 45 Chemistry, Bd. A27, "Vitamins", S. 443-613 (1996) VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten; und Ong, A.S., Niki, E. und Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease")

Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asien, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press (1995)), Enzyme und sämtliche anderen von Gutcho (1983) in Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086 und den darin angegebenen Literaturstellen, beschriebenen Chemikalien. Der Metabolismus und die Verwendungen bestimmter Feinchemikalien sind nachstehend weiter erläutert.

10

A. Aminosäure-Metabolismus und Verwendungen

Die Aminosäuren umfassen die grundlegenden Struktureinheiten sämtlicher Proteine und sind somit für die normalen Zellfunktionen essentiell. Der Begriff "Aminosäure" ist im Fachgebiet bekannt. Die proteinogenen Aminosäuren, von denen es 20 Arten gibt, dienen als Struktureinheiten für Proteine, in denen sie über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind, wohingegen die nicht-proteinogenen Aminosäuren (von denen Hunderte bekannt sind) gewöhnlich nicht in Proteinen vorkommen (siehe Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 57-97 VCH: Weinheim (1985)). Die Aminosäuren können in der D- oder L-Konfiguration vorliegen, obwohl L-Aminosäuren gewöhnlich der einzige Typ sind, den man in natürlich vorkommenden Proteinen vorfindet. Biosynthese- und Abbauwege von jeder der 20 proteinogenen Aminosäuren sind sowohl bei prokaryotischen als auch eukaryotischen Zellen gut charakterisiert (siehe bspw. Stryer, L. Biochemistry, 3. Auflage, S. 578-590 (1988)). Die "essentiellen" Aminosäuren (Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin, Tryptophan und Valin), so bezeichnet, da sie aufgrund der Komplexität ihrer Biosynthesen mit der Ernährung aufgenommen werden müssen, werden durch einfache Biosynthesewege in die übrigen 11 "nichtessentiellen" Aminosäuren (Alanin, Arginin, Asparagin, Aspartat, Cystein, Glutamat, Glutamin, Glycin, Prolin, Serin und Tyrosin) umgewandelt. Höhere Tiere besitzen die Fähigkeit, einige dieser Aminosäuren zu synthetisieren, jedoch müssen die essentiellen Aminosäuren mit der Nahrung aufgenommen werden, damit eine normale Proteinsynthese stattfindet.

Abgesehen von ihrer Funktion bei der Proteinbiosynthese sind diese Aminosäuren interessante Chemikalien an sich, und man hat entdeckt, daß viele bei verschiedenen Anwendungen in der Nahrungsmittel-, Futter-, Chemie-, Kosmetik-, Landwirtschafts- und pharmazeutischen Industrie zum Einsatz kommen. Lysin ist nicht nur für die Ernährung des Menschen eine wichtige Aminosäure, sondern auch für monogastrische Tiere, wie Geflügel und Schweine. Glutamat wird am häufigsten als Geschmacksadditiv (Mononatrium-

glutamat, MSG) sowie weithin in der Nahrungsmittelindustrie verwendet, wie auch Aspartat, Phenylalanin, Glycin und Cystein. Glycin, L-Methionin und Tryptophan werden sämtlich in der pharmazeutischen Industrie verwendet. Glutamin, Valin, Leucin, Isoleucin, 5 Histidin, Arginin, Prolin, Serin und Alanin werden in der pharmazeutischen Industrie und der Kosmetikindustrie verwendet. Threonin, Tryptophan und D-/L-Methionin sind weitverbreitete Futtermittelzusätze (Leuchtenberger, W. (1996) Amino acids - technical production and use, S. 466-502 in Rehm et al., (Hrsg.) Biotechnology Bd. 6, Kapitel 14a, VCH: Weinheim). Man hat entdeckt, daß 10 sich diese Aminosäuren außerdem als Vorstufen für die Synthese von synthetischen Aminosäuren und Proteinen, wie N-Acetylcystein, S-Carboxymethyl-L-cystein, (S)-5-Hydroxytryptophan und anderen, in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, 15 S. 57-97, VCH, Weinheim, 1985 beschriebenen Substanzen eignen.

Die Biosynthese dieser natürlichen Aminosäuren in Organismen, die sie produzieren können, bspw. Bakterien, ist gut charakterisiert worden (für einen Überblick der bakteriellen Aminosäure-Biosynthese und ihrer Regulation, s. Umbarger, H.E. (1978) Ann. Rev. Biochem. 47: 533 - 606). Glutamat wird durch reduktive Aminierung von α -Ketoglutarat, einem Zwischenprodukt im Citronensäure-Zyklus, synthetisiert. Glutamin, Prolin und Arginin werden jeweils nacheinander aus Glutamat erzeugt. Die Biosynthese von Serin erfolgt in einem Dreischritt-Verfahren und beginnt mit 3-Phosphoglycerat (einem Zwischenprodukt bei der Glykolyse), und ergibt nach Oxidations-, Transaminierungs- und Hydrolyseschritten diese Aminosäure. Cystein und Glycin werden jeweils aus Serin produziert, und zwar die erstere durch Kondensation von Homocystein 20 mit Serin, und die letztere durch Übertragung des Seitenketten- β -Kohlenstoffatoms auf Tetrahydrofolat, in einer durch Serin-transhydroxymethylase katalysierten Reaktion. Phenylalanin und Tyrosin werden aus den Vorstufen des Glykolyse- und Pentosephosphatweges, Erythrose-4-phosphat und Phosphoenolpyruvat in einem 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 898 900 902 904 906 908 910 912 914 916 918 920 922 924 926 928 930 932 934 936 938 940 942 944 946 948 950 952 954 956 958 960 962 964 966 968 970 972 974 976 978 980 982 984 986 988 990 992 994 996 998 999 1000 1001 1002 1003 1004 1005 1006 1007 1008 1009 1010 1011 1012 1013 1014 1015 1016 1017 1018 1019 1020 1021 1022 1023 1024 1025 1026 1027 1028 1029 1030 1031 1032 1033 1034 1035 1036 1037 1038 1039 1040 1041 1042 1043 1044 1045 1046 1047 1048 1049 1050 1051 1052 1053 1054 1055 1056 1057 1058 1059 1060 1061 1062 1063 1064 1065 1066 1067 1068 1069 1070 1071 1072 1073 1074 1075 1076 1077 1078 1079 1080 1081 1082 1083 1084 1085 1086 1087 1088 1089 1090 1091 1092 1093 1094 1095 1096 1097 1098 1099 1100 1101 1102 1103 1104 1105 1106 1107 1108 1109 1110 1111 1112 1113 1114 1115 1116 1117 1118 1119 1120 1121 1122 1123 1124 1125 1126 1127 1128 1129 1130 1131 1132 1133 1134 1135 1136 1137 1138 1139 1140 1141 1142 1143 1144 1145 1146 1147 1148 1149 1150 1151 1152 1153 1154 1155 1156 1157 1158 1159 1160 1161 1162 1163 1164 1165 1166 1167 1168 1169 1170 1171 1172 1173 1174 1175 1176 1177 1178 1179 1180 1181 1182 1183 1184 1185 1186 1187 1188 1189 1190 1191 1192 1193 1194 1195 1196 1197 1198 1199 1200 1201 1202 1203 1204 1205 1206 1207 1208 1209 1210 1211 1212 1213 1214 1215 1216 1217 1218 1219 1220 1221 1222 1223 1224 1225 1226 1227 1228 1229 1230 1231 1232 1233 1234 1235 1236 1237 1238 1239 12310 12311 12312 12313 12314 12315 12316 12317 12318 12319 12320 12321 12322 12323 12324 12325 12326 12327 12328 12329 12330 12331 12332 12333 12334 12335 12336 12337 12338 12339 123310 123311 123312 123313 123314 123315 123316 123317 123318 123319 123320 123321 123322 123323 123324 123325 123326 123327 123328 123329 123330 123331 123332 123333 123334 123335 123336 123337 123338 123339 123340 123341 123342 123343 123344 123345 123346 123347 123348 123349 123350 123351 123352 123353 123354 123355 123356 123357 123358 123359 123360 123361 123362 123363 123364 123365 123366 123367 123368 123369 123370 123371 123372 123373 123374 123375 123376 123377 123378 123379 123380 123381 123382 123383 123384 123385 123386 123387 123388 123389 123390 123391 123392 123393 123394 123395 123396 123397 123398 123399 1233100 1233101 1233102 1233103 1233104 1233105 1233106 1233107 1233108 1233109 1233110 1233111 1233112 1233113 1233114 1233115 1233116 1233117 1233118 1233119 1233120 1233121 1233122 1233123 1233124 1233125 1233126 1233127 1233128 1233129 1233130 1233131 1233132 1233133 1233134 1233135 1233136 1233137 1233138 1233139 1233140 1233141 1233142 1233143 1233144 1233145 1233146 1233147 1233148 1233149 1233150 1233151 1233152 1233153 1233154 1233155 1233156 1233157 1233158 1233159 1233160 1233161 1233162 1233163 1233164 1233165 1233166 1233167 1233168 1233169 1233170 1233171 1233172 1233173 1233174 1233175 1233176 1233177 1233178 1233179 1233180 1233181 1233182 1233183 1233184 1233185 1233186 1233187 1233188 1233189 1233190 1233191 1233192 1233193 1233194 1233195 1233196 1233197 1233198 1233199 1233200 1233201 1233202 1233203 1233204 1233205 1233206 1233207 1233208 1233209 1233210 1233211 1233212 1233213 1233214 1233215 1233216 1233217 1233218 1233219 1233220 1233221 1233222 1233223 1233224 1233225 1233226 1233227 1233228 1233229 1233230 1233231 1233232 1233233 1233234 1233235 1233236 1233237 1233238 1233239 1233240 1233241 1233242 1233243 1233244 1233245 1233246 1233247 1233248 1233249 1233250 1233251 1233252 1233253 1233254 1233255 1233256 1233257 1233258 1233259 1233260 1233261 1233262 1233263 1233264 1233265 1233266 1233267 1233268 1233269 1233270 1233271 1233272 1233273 1233274 1233275 1233276 1233277 1233278 1233279 1233280 1233281 1233282 1233283 1233284 1233285 1233286 1233287 1233288 1233289 1233280 1233281 1233282 1233283 1233284 1233285 1233286 1233287 1233288 1233289 1233290 1233291 1233292 1233293 1233294 1233295 1233296 1233297 1233298 1233299 1233290 1233291 1233292 1233293 1233294 1233295 1233296 1233297 1233298 1233299 1233300 1233301 1233302 1233303 1233304 1233305 1233306 1233307 1233308 1233309 1233310 1233311 1233312 1233313 1233314 1233315 1233316 1233317 1233318 1233319 1233320 1233321 1233322 1233323 1233324 1233325 1233326 1233327 1233328 1233329 1233330 1233331 1233332 1233333 1233334 1233335 1233336 1233337 1233338 1233339 1233330 1233331 1233332 1233333 1233334 1233335 1233336 1233337 1233338 1233339 1233340 1233341 1233342 1233343 1233344 1233345 1233346 1233347 1233348 1233349 1233340 1233341 1233342 1233343 1233344 1233345 1233346 1233347 1233348 1233349 1233350 1233351 1233352 1233353 1233354 1233355 1233356 1233357 1233358 1233359 1233350 1233351 1233352 1233353 1233354 1233355 1233356 1233357 1233358 1233359 1233360 1233361 1233362 1233363 1233364 1233365 1233366 1233367 1233368 1233369 1233360 1233361 1233362 1233363 1233364 1233365 1233366 1233367 1233368 1233369 1233370 1233371 1233372 1233373 1233374 1233375 1233376 1233377 1233378 1233379 1233370 1233371 1233372 1233373 1233374 1233375 1233376 1233377 1233378 1233379 1233380 1233381 1233382 1233383 1233384 1233385 1233386 1233387 1233388 1233389 1233380 1233381 1233382 1233383 1233384 1233385 1233386 1233387 1233388 1233389 1233390 1233391 1233392 1233393 1233394 1233395 1233396 1233397 1233398 1233399 1233390 1233391 1233392 1233393 1233394 1233395 1233396 1233397 1233398 1233399 12333100 12333101 12333102 12333103 12333104 12333105 12333106 12333107 12333108 12333109 12333110 12333111 12333112 12333113 12333114 12333115 12333116 12333117 12333118 12333119 12333110 12333111 12333112 12333113 12333114 12333115 12333116 12333117 12333118 12333119 123331100 123331101 123331102 123331103 123331104 123331105 123331106 123331107 123331108 123331109 123331110 123331111 123331112 123331113 123331114 123331115 123331116 123331117 123331118 123331119 123331110 123331111 123331112 123331113 123331114 123331115 123331116 123331117 123331118 123331119 1233311100 1233311101 1233311102 1233311103 1233311104 1233311105 1233311106 1233311107 1233311108 1233311109 1233311110 1233311111 1233311112 1233311113 1233311114 1233311115 1233311116 1233311117 1233311118 1233311119 1233311110 1233311111 1233311112 1233311113 1233311114 1233311115 1233311116 1233311117 1233311118 1233311119 12333111100 12333111101 12333111102 12333111103 12333111104 12333111105 12333111106 12333111107 12333111108 12333111109 12333111110 12333111111 12333111112 12333111113 12333111114 12333111115 12333111116 12333111117 12333111118 12333111119 12333111110 12333111111 12333111112 12333111113 12333111114 12333111115 12333111116 12333111117 12333111118 12333111119 123331111100 123331111101 123331111102 123331111103 123331111104 123331111105 123331111106 123331111107 123331111108 123331111109 123331111110 123331111111 123331111112 123331111113 123331111114 123331111115 123331111116 123331111117 123331111118 123331111119 123331111110 123331111111 123331111112 123331111113 123331111114 123331111115 123331111116 123331111117 123331111118 123331111119 1233311111100 1233311111101 1233311111102 1233311111103 1233311111104 1233311111105 1233311111106 1233311111107 1233311111108 1233311111109 1233311111110 1233311111111 1233311111112 1233311111113 1233311111114 1233311111115 1233311111116 1233311111117 1233311111118 1233311111119 1233311111110 1233311111111 1233311111112 1233311111113 1233311111114 1233311111115 1233311111116 1233311111117 1233311111118 1233311111119 12333111111100 12333111111101 12333111111102 12333111111103 12333111111104 12333111111105 12333111111106 12333111111107 12333111111108 12333111111109 12333111111110 12333111111111 12333111111112 12333111111113 12333111111114 12333111111115 12333111111116 12333111111117 12333111111118 12333111111119 12333111111110 12333111111111 12333111111112 12333111111113 12333111111114 12333111111115 12333111111116 12333111111117 12333111111118 12333111111119 123331111111100 123331111111101 123331111111102 123331111111103 123331111111104 123331111111105 123331111111106 123331111111107 123331111111108 123331111111109 123331111111110 123331111111111 123331111111112 123331111111113 123331111111114 123331111111115 123331111111116 123331111111117 123331111111118 123331111111119 123331111111110 123331111111111 123331111111112 123331111111113 123331111111114 123331111111115 123331111111116 123331111111117 123331111111118 123331111111119 1233311111111100 1233311111111101 1233311111111102 1233311111111103 1233311111111104 1233311111111105 1233311111111106 1233311111111107 1233311111111108 1233311111111109 1233311111111110 1233311111111111 1233311111111112 1233311111111113 1233311111111114 1233311111111115 1233311111111116 1233311111111117 1233311111111118 1233311111111119 1233311111111110 1233311111111111 1233311111111112 1233311111111113 1233311111111114 1233311111111115 1233311111111116 1233311111111117 1233311111111118 1233311111111119 12333111111111100 12333111111111101 12333111111111102 12333111111111103 12333111111111104 12333111111111105 12333111111111106 12333111111111107 12333111111111108 12333111111111109 12333111111111110 12333111111111111 12333111111111112 12333111111111113 12333111111111114 12333111111111115 12333111111111116 12333111111111117 12333111111111118 12333111111111119 12333111111111110 12333111111111111 12333111111111112 12333111111111113 12333111111111114 12333111111111115 12333111111111116 12333111111111117 12333111111111118 12333111111111119 123331111111111100 123331111111111101 123331111111111102 123331111111111103 123331111111111104 123331111111111105 123331111111111106 123331111111111107 123331111111111108 123331111111111109 123331111111111110 123331111111111111 123331111111111112 123331111111111113 123331111111111114 123331111111111115 123331111111111116 123331111111111117 123331111111111118 1233311111111111

11

Histidin aus 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat, einem aktivierten Zucker.

Aminosäuren, deren Menge den Proteinbiosynthesebedarf der Zelle 5 übersteigt, können nicht gespeichert werden, und werden stattdessen abgebaut, so daß Zwischenprodukte für die Haupt-Stoffwechselwege der Zelle bereitgestellt werden (für einen Überblick siehe Stryer, L., Biochemistry, 3. Aufl. Kap. 21 "Amino Acid Degradation and the Urea Cycle"; S 495-516 (1988)). Die Zelle ist 10 zwar in der Lage, ungewünschte Aminosäuren in nützliche Stoffwechsel-Zwischenprodukte umzuwandeln, jedoch ist die Aminosäureproduktion hinsichtlich der Energie, der Vorstufenmoleküle und der für ihre Synthese nötigen Enzyme aufwendig. Es überrascht daher nicht, daß die Aminosäure-Biosynthese durch Feedback-Hemmung 15 reguliert wird; wobei das Vorliegen einer bestimmten Aminosäure ihre eigene Produktion verlangsamt oder ganz beendet (für einen Überblick über den Rückkopplungs-Mechanismus bei Aminosäure-Biosynthesewegen, siehe Stryer, L., Biochemistry, 3. Aufl., Kap. 24, "Biosynthesis of Amino Acids and Heme", S. 575-600 (1988)). Der 20 Ausstoß einer bestimmten Aminosäure wird daher durch die Menge dieser Aminosäure in der Zelle eingeschränkt.

B. Vitamine, Cofaktoren und Nutraceutika-Metabolismus sowie Verwendungen

25 Vitamine, Cofaktoren und Nutraceutika umfassen eine weitere Gruppe von Molekülen. Höhere Tiere haben die Fähigkeit verloren, diese zu synthetisieren und müssen sie somit aufnehmen, obwohl sie leicht durch andere Organismen, wie Bakterien, synthetisiert 30 werden. Diese Moleküle sind entweder biologisch aktive Moleküle an sich oder Vorstufen von biologisch aktiven Substanzen, die als Elektronenträger oder Zwischenprodukte bei einer Reihe von Stoffwechselwegen dienen. Diese Verbindungen haben neben ihrem Nährwert auch einen signifikanten industriellen Wert als Farbstoffe, 35 Antioxidantien und Katalysatoren oder andere Verarbeitungs-Hilfstoffe. (Für einen Überblick über die Struktur, Aktivität und die industriellen Anwendungen dieser Verbindungen siehe bspw. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996). Der Begriff "Vitamin" ist im 40 Fachgebiet bekannt und umfaßt Nährstoffe, die von einem Organismus für eine normale Funktion benötigt werden, jedoch nicht von diesem Organismus selbst synthetisiert werden können. Die Gruppe der Vitamine kann Cofaktoren und nutraceutische Verbindungen umfassen. Der Begriff "Cofaktor" umfaßt nicht-proteinartige Verbindungen, die für das Auftreten einer normalen Enzymaktivität nötig 45 sind. Diese Verbindungen können organisch oder anorganisch sein; die erfindungsgemäßen Cofaktor-Moleküle sind vorzugsweise orga-

nisch. Der Begriff "Nutraceutikum" umfaßt Nahrungsmittelzusätze, die bei Pflanzen und Tieren, insbesondere dem Menschen, gesundheitsfördernd sind. Beispiele solcher Moleküle sind Vitamine, Antioxidantien und ebenfalls bestimmte Lipide (z.B. mehrfach 5 ungesättigte Fettsäuren).

Die Biosynthese dieser Moleküle in Organismen, die zu ihrer Produktion befähigt sind, wie Bakterien, ist umfassend charakterisiert worden (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 10 "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996, Michal, G. (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley & Sons; Ong, A.S., Niki, E. und Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and 15 Technological Associations in Malaysia and the Society for free Radical Research - Asien, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press, Champaign, IL X, 374 S).

Thiamin (Vitamin B₁) wird durch chemisches Kuppeln von Pyrimidin 20 und Thiazol-Einheiten gebildet. Riboflavin (Vitamin B₂) wird aus Guanosin-5'-triphosphat (GTP) und Ribose-5'-phosphat synthetisiert. Riboflavin wiederum wird zur Synthese von Flavinmononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD) eingesetzt. Die Familie von Verbindungen, die gemeinsam als "Vitamin B6" bezeichnet werden (bspw. Pyridoxin, Pyridoxamin, Pyridoxal-5'-phosphat und das kommerziell verwendete Pyridoxinhydrochlorid), sind alle Derivate der gemeinsamen Struktureinheit 5-Hydroxy-6-methylpyridin. Pantothensäure, R-(+)-N-(2,4-Dihydroxy-3,3-dimethyl-1-oxobutyl)-β-alanin) kann entweder durch chemische 25 Synthese oder durch Fermentation hergestellt werden. Die letzten Schritte bei der Pantothensäure-Biosynthese bestehen aus der ATP-ge-triebenen Kondensation von β-Alanin und Pantoinsäure. Die für die Biosyntheseschritte für die Umwandlung in Pantoinsäure, in β-Alanin und zur Kondensation in Pantothensäure verantwortlichen En- 30 zyme sind bekannt. Die metabolisch aktive Form von Pantothensäure ist Coenzym A, dessen Biosynthese über 5 enzymatische Schritte verläuft. Pantothensäure, Pyridoxal-5'-phosphat, Cystein und ATP sind die Vorstufen von Coenzym A. Diese Enzyme katalysieren nicht nur die Bildung von Pantothensäure, sondern auch die Produktion von 35 (R)-Pantoinsäure, (R)-Pantolacton, (R)-Panthenol (Provitamin B₅), Pantethein (und seinen Derivaten) und Coenzym A.

Die Biosynthese von Biotin aus dem Vorstufenmolekül Pimeloyl-CoA in Mikroorganismen ist ausführlich untersucht worden, und man hat 45 mehrere der beteiligten Gene identifiziert. Es hat sich herausgestellt, daß viele der entsprechenden Proteine an der Fe-Cluster-Synthese beteiligt sind und zu der Klasse der nifS-Proteine gehö-

ren. Die Liponsäure wird von der Octanonsäure abgeleitet und dient als Coenzym beim Energie-Metabolismus, wo sie Bestandteil des Pyruvatdehydrogenasekomplexes und des α -Ketoglutaratdehydrogenasekomplexes wird. Die Folate sind eine Gruppe von Substanzen, die alle von der Folsäure abgeleitet werden, die wiederum von L-Glutaminsäure, p-Aminobenzoësäure und 6-Methylpterin hergeleitet ist. Die Biosynthese der Folsäure und ihrer Derivate, ausgehend von den metabolischen Stoffwechselzwischenprodukten Guanosin-5'-triphosphat (GTP), L-Glutaminsäure und p-Aminobenzoësäure ist in bestimmten Mikroorganismen eingehend untersucht worden.

Corrinoide (wie die Cobalamine und insbesondere Vitamin B₁₂) und die Porphyrine gehören zu einer Gruppe von Chemikalien, die sich durch ein Tetrapyrrol-Ringsystem auszeichnen. Die Biosynthese von Vitamin B₁₂ ist hinreichend komplex, daß sie noch nicht vollständig charakterisiert worden ist, jedoch ist inzwischen ein Großteil der beteiligten Enzyme und Substrate bekannt. Nikotinsäure (Nikotinat) und Nikotinamid sind Pyridin-Derivate, die auch als "Niacin" bezeichnet werden. Niacin ist die Vorstufe der wichtigen Coenzyme NAD (Nikotinamidadenindinukleotid) und NADP (Nikotinamidadenindinukleotidphosphat) und ihrer reduzierten Formen.

Die Produktion dieser Verbindungen im Großmaßstab beruht größtenteils auf zellfreien chemischen Synthesen, obwohl einige dieser Chemikalien ebenfalls durch großangelegte Anzucht von Mikroorganismen produziert worden sind, wie Riboflavin, Vitamin B₆, Pantothenat und Biotin. Nur Vitamin B₁₂ wird aufgrund der Komplexität seiner Synthese lediglich durch Fermentation produziert. In-vitro-Verfahren erfordern einen erheblichen Aufwand an Materialien und Zeit und häufig an hohen Kosten.

C. Purin-, Pyrimidin-, Nukleosid- und Nukleotid-Metabolismus und Verwendungen

Gene für den Purin- und Pyrimidin-Stoffwechsel und ihre entsprechenden Proteine sind wichtige Ziele für die Therapie von Tumorerkrankungen und Virusinfektionen. Der Begriff "Purin" oder "Pyrimidin" umfaßt stickstoffhaltige Basen, die Bestandteil der Nukleinsäuren, Coenzyme und Nukleotide sind. Der Begriff "Nukleotid" beinhaltet die grundlegenden Struktureinheiten der Nukleinsäuremoleküle, die eine stickstoffhaltige Base, einen Pentosezucker (bei RNA ist der Zucker Ribose, bei DNA ist der Zucker D-Desoxyribose) und Phosphorsäure umfassen. Der Begriff "Nukleosid" umfaßt Moleküle, die als Vorstufen von Nukleotiden dienen, die aber im Gegensatz zu den Nukleotiden keine Phosphorsäureeinheit aufweisen. Durch Hemmen der Biosynthese dieser Moleküle oder ihrer Mobilisation zur Bildung von Nukleinsäuremolekülen ist es

möglich, die RNA- und DNA-Synthese zu hemmen; wird diese Aktivität zielgerichtet bei kanzerogenen Zellen gehemmt, lässt sich die Teilungs- und Replikations-Fähigkeit von Tumorzellen hemmen. Es gibt zudem Nukleotide, die keine Nukleinsäuremoleküle bilden, jedoch 5 doch als Energiespeicher (d.h. AMP) oder als Coenzyme (d.h. FAD und NAD) dienen.

Mehrere Veröffentlichungen haben die Verwendung dieser Chemikalien für diese medizinischen Indikationen beschrieben, wobei der 10 Purin- und/oder Pyrimidin-Metabolismus beeinflusst wird (bspw. Christoperson, R.I. und Lyons, S.D. (1990) "Potent inhibitors of de novo pyrimidine and purine biosynthesis as chemotherapeutic agents", Med. Res. Reviews 10: 505-548). Untersuchungen an Enzymen, die am Purin- und Pyrimidin-Metabolismus beteiligt sind, haben 15 sich auf die Entwicklung neuer Medikamente konzentriert, die bspw. als Immunsuppressionsmittel oder Antiproliferantien verwendet werden können (Smith, J.L. "Enzymes in Nucleotide Synthesis" Curr. Opin. Struct. Biol. 5 (1995) 752-757; Biochem. Soc. Transact. 23 (1995) 877-902). Die Purin- und Pyrimidinbasen, Nukleotide und Nukleotide haben jedoch auch andere Einsatzmöglichkeiten: 20 als Zwischenprodukte bei der Biosynthese verschiedener Feinchemikalien (z.B. Thiamin, S-Adenosyl-methionin, Folate oder Riboflavin), als Energieträger für die Zelle (bspw. ATP oder GTP) und für Chemikalien selbst, werden gewöhnlich als Geschmacksverstärker verwendet (bspw. IMP oder GMP) oder für viele medizinische Anwendungen (siehe bspw. Kuninaka, A., (1996) "Nucleotides and Related Compounds in Biotechnology Bd. 6, Rehm et al., Hrsg. VCH: Weinheim, S. 561-612). Enzyme, die am Purin-, Pyrimidin-, Nukleosid- oder Nukleotid-Metabolismus beteiligt sind, dienen 25 auch immer stärker als Ziele, gegen die Chemikalien für den Pflanzenschutz, einschließlich Fungiziden, Herbiziden und Insektiziden entwickelt werden.

Der Metabolismus dieser Verbindungen in Bakterien ist charakterisiert worden (für Übersichten siehe bspw. Zalkin, H. und Dixon, 35 J.E. (1992) "De novo purin nucleotide biosynthesis" in Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology, Bd. 42, Academic Press, S. 259-287; und Michal, G. (1999) "Nucleotides and Nucleosides", Kap. 8 in: Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, Wiley, New York). Der Purin-Metabolismus, das Objekt intensiver Forschung, ist für das normale Funktionieren der Zelle essentiell. Ein gestörter Purin-Metabolismus in höheren Tieren kann schwere Erkrankungen verursachen, bspw. Gicht. Die Purinnukleotide werden über eine Reihe von Schritten 40 über die Zwischenverbindung Inosin-5'-phosphat (IMP) aus Ribose-5-phosphat synthetisiert, was zur Produktion von Guanosin-5'-monophosphat (GMP) oder Adenosin-5'-monophosphat (AMP)

führt, aus denen sich die als Nukleotide verwendeten Triphosphat-
formen leicht herstellen lassen. Diese Verbindungen werden auch
als Energiespeicher verwendet, so daß ihr Abbau Energie für viele
verschiedene biochemische Prozesse in der Zelle liefert. Die
5 Pyrimidinbiosynthese erfolgt über die Bildung von Uridin-5'-mono-
phosphat (UMP) aus Ribose-5-phosphat. UMP wiederum wird in Cytidin-5'-triphosphat (CTP) umgewandelt. Die Desoxyformen sämtlicher
Nukleotide werden in einer Einschritt-Reduktionsreaktion aus der
10 Diphosphat-Riboseform des Nukleotides zur Diphosphat-Desoxy-
riboseform des Nukleotides hergestellt. Nach der Phosphorylierung
können diese Moleküle an der DNA-Synthese teilnehmen.

D. Trehalose-Metabolismus und Verwendungen

15 Trehalose besteht aus zwei Glucosemolekülen, die über
α,α-1,1-Bindung miteinander verknüpft sind. Sie wird gewöhnlich
in der Nahrungsmittelindustrie als Süßstoff, als Additiv für ge-
trocknete oder gefrorene Nahrungsmittel sowie in Getränken ver-
wendet. Sie wird jedoch auch in der pharmazeutischen Industrie,
20 der Kosmetik- und Biotechnologie-Industrie angewendet (s. bspw.
Nishimoto et al., (1998) US-Patent Nr. 5 759 610; Singer, M.A.
und Lindquist, S. Trends Biotech. 16 (1998) 460-467; Paiva,
C.L.A. und Panek, A.D. Biotech Ann. Rev. 2 (1996) 293-314; und
Shiosaka, M. J. Japan 172 (1997) 97-102). Trehalose wird durch
25 Enzyme von vielen Mikroorganismen produziert und auf natürliche
Weise in das umgebende Medium abgegeben, aus dem sie durch im
Fachgebiet bekannte Verfahren gewonnen werden kann.

II. Membran-Biosynthese und Transmembran-Transport

30 Die Zellmembranen dienen in einer Zelle einer Reihe von Funktio-
nen. Zuallererst differenziert eine Membran den Zellinhalt von
der Umgebung, so daß die Zelle Integrität erhält. Die Membranen
dienen auch als Schranken, damit gefährliche oder ungewünschte
35 Verbindungen nicht einströmen können und gewünschte Verbindungen
nicht ausströmen können. Zellmembranen sind aufgrund ihrer Struk-
tur von Natur aus gegenüber der nicht erleichterten Diffusion
hydrophiler Verbindungen, wie Proteine, Wassermolekülen und Ionen
undurchlässig: eine Doppelschicht aus Lipidmolekülen, in der die
40 polaren Kopfgruppen nach außen ragen (aus der Zelle heraus bzw.
ins Zellinnere hinein) und die unpolaren Schwänze zur Mitte der
Doppelschicht ragen und einen hydrophoben Kern bilden (für einen
allgemeinen Überblick über die Struktur und Funktion der Membran
siehe Gennis, R.B. (1989) Biomembranes, Molecular Structure and
45 Function, Springer: Heidelberg). Diese Schranke ermöglicht, daß
die Zellen eine relativ höhere Konzentration an gewünschten Ver-
bindungen und eine relativ kleinere Konzentration an ungewünsch-

ten Verbindungen als das umgebende Medium enthält, da die Diffusion dieser Verbindungen durch die Membran effizient blockiert wird.

5 Die Membran liefert jedoch auch eine wirksame Schranke gegenüber, dem Import von gewünschten Molekülen und dem Export von Abfallmolekülen. Zur Bewältigung dieser Schwierigkeit enthalten die Zellmembranen viele Arten von Transporterproteinen, die den Transmembrantransport verschiedenartiger Verbindungen erleichtern

10 können: Poren oder Kanäle und Transporter. Die ersteren sind integrale Membranproteine, gelegentlich Proteinkomplexe, die eine regulierte Öffnung durch die Membran bilden. Diese Regulation oder dieses "Gating" ist gewöhnlich für die durch die Pore oder den Kanal zu transportierenden spezifisch, so daß diese Trans-

15 membrankonstrukte für eine spezifische Klasse von Substraten spezifisch sind; bspw. ist ein Kaliumkanal derart konstruiert, daß nur Ionen mit ähnlicher Ladung und Größe wie Kalium hindurchgelangen können. Kanal- und Porenproteine haben bestimmte hydrophobe und hydrophile Domänen, so daß sich der hydrophobe Anteil

20 des Proteins an das Innere der Membran anlagern kann, wohingegen der hydrophile Anteil das Innere des Kanals ausmacht, wodurch eine geschützte hydrophile Umgebung bereitgestellt wird, durch die das ausgewählte hydrophile Molekül gelangen kann. Im Fachgebiet sind viele solche Poren/Kanäle bekannt, einschließlich

25 solche für Kalium-, Calcium-, Natrium- und Chloridionen.

Dieses durch Poren und Kanäle vermittelte System ist auf sehr kleine Moleküle, wie Ionen, eingeschränkt, da Poren oder Kanäle, die hinreichend groß sind, daß sie den Durchtritt vollständiger

30 Proteine durch erleichterte Diffusion ermöglichen, auch nicht dazu fähig wären, den Durchtritt kleinerer Moleküle zu verhindern. Der Transport von Molekülen durch diesen Prozeß wird gelegentlich als "erleichterte Diffusion" bezeichnet, da die treibende Kraft eines Konzentrationsgradienten erforderlich ist,

35 damit der Transport stattfindet. Permeasen ermöglichen ebenfalls die erleichterte Diffusion größerer Moleküle, wie Glucose oder anderer Zucker, in die Zelle, wenn die Konzentration dieser Moleküle auf einer Seite der Membran größer ist als auf der anderen (ebenfalls als "Uniport" bezeichnet). Im Gegensatz zu Poren oder

40 Kanälen bilden diese integralen Proteine (die oft 6 bis 14 membranüberspannende α -Helices aufweisen) keine offenen Kanäle durch die Membran, sie binden jedoch an das Zielmolekül an der Membranoberfläche und durchlaufen dann eine Konformationsänderung, so daß das Zielmolekül an der entgegengesetzten Seite der Membran

45 freigesetzt wird.

Zellen benötigen jedoch oft den Import oder Export von Molekülen gegen den bestehenden Konzentrationsgradienten ("aktiver Transport"), eine Situation, in der die erleichterte Diffusion nicht stattfinden kann. Es gibt zwei generelle Mechanismen, die von der Zelle für einen solchen Membrantransport verwendet wird; Symport oder Antiport, und energiegekuppelter Transport, wie derjenige, der durch ABC-Transporter vermittelt wird. Symport- und Antiport-systeme koppeln die Bewegung von zwei unterschiedlichen Molekülen über die Membran (über Permeasen mit zwei gesonderten Bindungsstellen für zwei unterschiedliche Moleküle); beim Symport werden beide Moleküle in die gleiche Richtung transportiert, wohingegen beim Antiport ein Molekül importiert und das andere Molekül exportiert wird. Dies ist energetisch möglich, da sich eines dieser beiden Moleküle entlang eines Konzentrationsgradienten bewegt, und dieses energetisch günstige Ereignis wird nur durch die gleichzeitige Bewegung einer gewünschten Verbindung gegen den herrschenden Konzentrationsgradienten ermöglicht. Einzelne Moleküle können gegen den Konzentrationsgradienten über die Membran in einem energiegetriebenen Prozeß transportiert werden, wie bspw. bei den ABC-Transportern. Bei diesem System hat das in der Membran lokalisierte Transportprotein eine ATP-bindende Cassette, beim Binden des Zielmoleküls wird ATP in ADP + Pi umgewandelt, und die resultierende freigesetzte Energie wird zum Antreiben der Bewegung des Zielmoleküls zur entgegengesetzten Seite der Membran verwendet, was durch den Transporter erleichtert wird. Für eingehendere Beschreibungen all dieser Transportsysteme, siehe Bamberg, E. et al., (1993) "Charge transport of ion pumps on lipid bilayer membranes", Q. Rev. Biophys. 26: 1-25; Findlay, J.B.C. (1991) "Structure and function in membrane transport systems", Curr. Opin. Struct. Biol. 1: 804-810; Higgins, C.F. (1992) "ABC transporters from microorganisms to man", Ann. Rev. Cell. Biol. 8: 67-113; Gennis, R.B. (1989) "Pores, Channels and Transporters", in Biomebranes, Molecular Structure and Function, Springer: Heidelberg, S. 270-322; und Nikaido, H. und Saier, H. (1992) "Transport proteins in bacteria: common themes in their design", Science 258: 936-942, und die in jeder dieser Zitate enthaltenen Literaturstellen.

Die Synthese von Membranen ist ein gut charakterisierter Prozeß, an dem viele Komponenten beteiligt sind, von denen die wichtigsten die Lipidmoleküle sind. Die Lipidsynthese lässt sich in zwei Teile aufteilen: die Synthese von Fettsäuren und ihre Bindung an sn-Glycerin-3-Phosphat und die Addition oder Modifikation einer polaren Kopfgruppe. Übliche Lipide, die in Bakterienmembranen verwendet werden, umfassen Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide und Phosphoglyceride. Die Fettsäuresynthese beginnt mit der Umwandlung von Acetyl-CoA in Malonyl-CoA durch Acetyl-CoA-carbo-

xylase oder in Acetyl-ACP durch Acetyltransacylase. Nach einer Kondensationsreaktion bilden diese beiden Produktmoleküle zusammen Acetoacetyl-ACP, das durch eine Reihe von Kondensations-, Reduktions- und Dehydratisierungsreaktionen umgewandelt wird, so daß ein gesättigtes Fettsäuremolekül mit der gewünschten Kettenlänge erhalten wird. Die Produktion der ungesättigten Fettsäuren aus diesen Molekülen wird durch spezifische Desaturasen katalysiert, und zwar entweder aerob mittels molekularem Sauerstoff oder anaerob (für Beschreibungen der Fettsäuresynthese siehe F.C. 10 Neidhardt et al. (1996) *E. coli* und *Salmonella*. ASM Press: Washington, D.C. S. 612-636 und die darin angegebenen Literaturstellen; Lengeler et al. (Hrsg.) (1999) *Biology of Prokaryotes*. Thieme: Stuttgart, New York und die darin angegebenen Literaturstellen, und Magnuson, K. et al. (1993) *Microbiological Reviews* 15 57: 522-542 und die darin angegebenen Literaturstellen). Die Cyclopropan-Fettsäuren (CFA) werden durch eine spezifische CFA-Synthase mit SAM als Cosubstrat synthetisiert. Verzweigte Fettsäureketten werden aus verzweigten desaminierten Aminosäureketten synthetisiert, so daß verzweigte 2-Oxosäuren erhalten werden (s. 20 Lengeler et al. (Hrsg) (1999) *Biology of Prokaryotes*. Thieme: Stuttgart, New York und die darin angegebenen Literaturstellen). Ein weiterer wesentlicher Schritt bei der Lipidsynthese ist der Transfer von Fettsäuren auf die polaren Kopfgruppen bspw. durch Glycerinphosphatacyltransferasen. Die Kombination verschiedener 25 Vorstufenmoleküle und Biosyntheseenzyme bewirkt die Produktion verschiedener Fettsäuremoleküle, was eine erhebliche Auswirkung auf die Membranzusammensetzung hat.

III. Erfindungsgemäße Elemente und Verfahren

30 Die vorliegende Erfindung beruht zumindest teilweise auf der Entdeckung von neuen Molekülen, die hier als MCT-Nukleinsäure- und -Protein-Moleküle bezeichnet werden und die Produktion von Zellmembranen in *C. glutamicum* steuern sowie die Bewegung von Molekülen über diese Membranen bewerkstelligen. Bei einer Ausführungsform sind die MCT-Moleküle am Metabolismus von Verbindungen beteiligt, die für den Aufbau der Zellmembranen in *C. glutamicum* oder am Transport der Moleküle über diese Membranen beteiligt sind. Bei einer bevorzugten Ausführungsform hat die Aktivität der 35 erfindungsgemäßen MCT-Moleküle zur Regulation der Produktion von Membrankomponenten eine Auswirkung auf die Produktion einer gewünschten Feinchemikalie durch diesen Organismus. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Aktivität der modulierten MCT-Moleküle derart moduliert, daß die *C. glutamicum*- 40 Stoffwechselwege, die von den erfindungsgemäßen MCT-Proteinen reguliert werden, hinsichtlich Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion moduliert sind sowie hinsichtlich der 45

Effizienz des Transports der Verbindungen durch die Membranen verändert sind, was die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Feinchemikalie durch *C. glutamicum* entweder direkt oder indirekt moduliert.

5

Der Begriff "MCT-Protein" oder "MCT-Polypeptid" umfaßt Proteine, die am Stoffwechsel von Verbindungen, die für den Aufbau von Zellmembranen in *C. glutamicum* notwendig sind, oder am Transport von Molekülen über diese Membranen beteiligt sind. Beispiele für

10 MCT-Proteine umfassen solche, die von den in Tabelle 1 und Anhang A aufgeführten MCT-Genen codiert werden. Die Ausdrücke "MCT-Gen" oder "MCT-Nukleinsäuresequenz" umfassen Nukleinsäuresequenzen, die ein MCT-Protein codieren, das aus einem codierenden Bereich und entsprechenden untranslatierten 5'- und 3'-Sequenzbereichen

15 besteht. Beispiele für MCT-Gene sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Die Begriffe "Produktion" oder "Produktivität" sind im Fachgebiet bekannt und beinhalten die Konzentration des Fermentationsproduktes (bspw. der gewünschten Feinchemikalie, die innerhalb einer festgelegten Zeitspanne und eines festgelegten Fermentationsvolu-

20 mens gebildet werden (bspw. kg Produkt pro Std. pro l). Der Begriff "Effizienz der Produktion" umfaßt die Zeit, die zur Erziehung einer bestimmten Produktionsmenge nötig ist (bspw. wie lange die Zelle zur Aufrichtung einer bestimmten Durchsatzrate einer Feinchemikalie benötigt). Der Begriff "Ausbeute" oder "Produkt/

25 Kohlenstoff-Ausbeute" ist im Fachgebiet bekannt und umfaßt die Effizienz der Umwandlung der Kohlenstoffquelle in das Produkt (d.h. die Feinchemikalie). Dies wird bspw. gewöhnlich ausgedrückt als kg Produkt pro kg Kohlenstoffquelle. Durch Vergrößern der Ausbeute oder Produktion der Verbindung wird die Menge der gewon-

30 nen Moleküle oder der geeigneten gewonnenen Moleküle dieser Verbindung in einer bestimmten Kulturmenge über einen festgelegten Zeitraum erhöht. Die Begriffe "Biosynthese" oder "Biosyntheseweg" sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Synthese einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine

35 Zelle aus Zwischenverbindungen, bspw. in einem Mehrschritt- oder stark regulierten Prozeß. Die Begriffe "Abbau" oder "Abbauweg" sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Spaltung einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine Zelle in Abbauprodukte (allgemeiner gesagt, kleinere oder weniger

40 komplexe Moleküle), bspw. in einem Mehrschritt- oder stark regulierten Prozeß. Der Begriff "Metabolismus" ist im Fachgebiet bekannt und umfaßt die Gesamtheit der biochemischen Reaktionen, die in einem Organismus stattfinden. Der Metabolismus einer bestimmten Verbindung (z.B. der Metabolismus einer Aminosäure, wie

45 Glycin) umfaßt dann sämtliche Biosynthese-, Modifikations- und Abbauwege dieser Verbindung in der Zelle.

Die erfindungsgemäßen MCT-Moleküle sind in einer anderen Ausführungsform befähigt, die Produktion eines gewünschten Moleküls, wie einer Feinchemikalie, in einem Mikroorganismus, wie *C. glutamicum*, zu modulieren. Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch 5 die die Veränderung eines erfindungsgemäßen MCT-Proteins die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie aus einem *C. glutamicum*-Stamm, der ein solches verändertes Protein enthält, direkt beeinflussen kann. Diese MCT-Proteine, die am Export der Feinchemikalienmoleküle aus der Zelle 10 beteiligt sind, können in größerer Anzahl vorliegen oder erhöhte Aktivität aufweisen, so daß größere Mengen dieser Verbindungen in das extrazelluläre Medium sezerniert werden, aus dem sie leichter gewonnen werden können. MCT-Proteine, die am Import der Nährstoffe beteiligt sind, die für die Biosynthese von einer oder 15 mehreren Feinchemikalien notwendig sind (bspw. Phosphat, Sulfat, Stickstoffverbindungen, usw.) können entsprechend in größerer Anzahl oder mit höherer Aktivität zugegen sein, so daß diese Vorstufen-, Cofaktör- oder Zwischenverbindungen in höherer Konzentration in der Zelle vorliegen. Zudem sind Fettsäuren und Lipide 20 selbst wünschenswerte Feinchemikalien; durch Optimieren der Aktivität oder Vergrößern der Anzahl von einem oder mehreren erfindungsgemäßen MCT-Proteinen, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Beeinflussen der Aktivität von einem oder mehreren MCT-Proteinen, die am Abbau dieser Verbindungen 25 beteiligt sind, kann man die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Fettsäure- und Lipidmolekülen aus *C. glutamicum* steigern.

Die Mutagenese von einem oder mehreren erfindungsgemäßen Genen 30 kann auch MCT-Proteine mit veränderten Aktivitäten hervorbringen, die die Produktion von einer oder mehreren Feinchemikalien aus *C. glutamicum* beeinflussen. Erfindungsgemäße MCT-Proteine, die am Export von Abfallprodukten beteiligt sind, können in größerer Anzahl oder höherer Aktivität zugegen sein, so daß die normalen 35 Stoffwechselabfälle der Zelle (aufgrund von Überproduktion der gewünschten Feinchemikalie möglicherweise in höherer Quantität) effizient exportiert werden, bevor sie Nukleotide und Proteine innerhalb der Zelle beschädigen (was die Lebensfähigkeit der Zelle herabsetzt) oder mit anderen Feinchemikalien-Stoffwechsel- 40 wegen interagieren (was die Ausbeute, Produktion oder Effizienz der Produktion der gewünschten Feinchemikalie herabsetzt). Die relativ großen intrazellulären Mengen der gewünschten Feinchemikalie können an sich für die Zelle toxisch sein. Durch Vergrößern der Anzahl von Transportern, die zum Export dieser Verbindung aus 45 der Zelle befähigt ist, kann man somit die Lebensfähigkeit der Zelle in Kultur steigern, was wiederum eine größere Zahl an Zellen in Kultur mit sich bringt, die die gewünschte Feinchemikalie

produzieren. Die erfindungsgemäßen MCT-Proteine lassen sich derart manipulieren, daß die relativen Mengen unterschiedlicher Lipid- und Fettsäuremoleküle produziert werden. Dies kann eine erhebliche Auswirkung auf die Lipidzusammensetzung der Zellmembran haben. Da jeder Lipidtyp andere physikalische Eigenschaften aufweist, kann eine Veränderung der Lipidzusammensetzung einer Membran die Membranfluidität signifikant verändern. Änderungen der Membranfluidität können den Transport von Molekülen über die Membran sowie die Zellintegrität beeinflussen, was jeweils eine erhebliche Auswirkung auf die Produktion von Feinchemikalien von *C. glutamicum* in großangelegten Fermenterkulturen hat.

Die isolierten erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen befinden sich im Genom eines *Corynebacterium glutamicum*-Stammes, der von der American Type Culture Collection unter der Bezeichnung ATCC 13032 erhältlich ist. Die Nukleotidsequenz der isolierten *C. glutamicum*-MCT-cDNAs und die vorhergesagten Aminosäuresequenzen der *C. glutamicum*-MCT-Proteine sind im Anhang A bzw. B gezeigt. Es wurden Computeranalysen durchgeführt, die diese Nukleotidsequenzen als Sequenzen klassifizierten und/oder identifizierten, die Proteine codieren, die am Metabolismus von Zellmembrankomponenten beteiligt sind, oder Proteine, die am Transport von Verbindungen über die Membran beteiligt sind.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Proteine, deren Aminosäuresequenz zu einer Aminosäuresequenz in Anhang B im wesentlichen homolog ist. Wie hier verwendet, ist ein Protein, dessen Aminosäuresequenz zu einer ausgewählten Aminosäuresequenz im wesentlichen homolog ist, zur ausgewählten Aminosäuresequenz zumindest zu etwa 50% homolog, bspw. zur gesamten ausgewählten Aminosäuresequenz. Ein Protein, dessen Aminosäuresequenz zu einer ausgewählten Aminosäuresequenz im wesentlichen homolog ist, kann auch mindestens zu etwa 50-60%, vorzugsweise mindestens zu etwa 60-70%, stärker bevorzugt mindestens etwa 70-80%, 80-90% oder 90-95% und am stärksten bevorzugt mindestens zu etwa 96%, 97%, 98%, 99% oder noch homologer zur ausgewählten Aminosäuresequenz sein.

Das erfindungsgemäße MCT-Protein oder ein biologisch aktiver Abschnitt oder Fragmente davon können am Metabolismus von Verbindungen, die für den Aufbau der Zellmembranen in *C. glutamicum* notwendig sind, oder am Transport von Molekülen über diese Membranen beteiligt sein, oder können eine oder mehrere der in Tabelle 1 aufgeführten Aktivitäten aufweisen.

In den nachstehenden Unterabschnitten sind verschiedene Aspekte der Erfindung ausführlicher beschrieben:

A. Isolierte Nukleinsäuremoleküle

5

Ein Aspekt der Erfindung betrifft isolierte Nukleinsäuremoleküle, die MCT-Polypeptide oder biologisch aktive Abschnitte davon codieren, sowie Nukleinsäurefragmente, die zur Verwendung als Hybridisierungssonden oder Primer zur Identifizierung oder

10 Amplifizierung von MCT-codierenden Nukleinsäuren (z.B. MCT-DNA) hinreichen. Der Begriff "Nukleinsäuremolekül" soll DNA-Moleküle (z.B. cDNA oder genomische DNA) und RNA-Moleküle (z.B. mRNA) sowie DNA- oder RNA-Analoga, die mittels Nukleotidanaloga erzeugt werden, umfassen. Dieser Begriff umfaßt zudem die am 3'- und

15 am 5'-Ende des codierenden Genbereichs gelegene untranslatierte Sequenz: mindestens etwa 100 Nukleotide der Sequenz stromaufwärts des 5'-Endes des codierenden Bereichs und mindestens etwa 20 Nukleotide der Sequenz stromabwärts des 3'-Endes des codierenden Genbereichs. Das Nukleinsäuremolekül kann einzelsträngig oder

20 doppelsträngig sein, ist aber vorzugsweise eine doppelsträngige DNA. Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül wird aus anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle der Nukleinsäure zugegen sind. Eine "isolierte" Nukleinsäure hat vorzugsweise keine Sequenzen, die die Nukleinsäure in der genomi-

25 schen DNA des Organismus, aus dem die Nukleinsäure stammt, natürlicherweise flankieren (bspw. Sequenzen, die sich am 5'- bzw. 3'-Ende der Nukleinsäure befinden). In verschiedenen Ausführungsformen kann bspw. das isolierte MCT-Nukleinsäuremolekül weniger als etwa 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb oder 0,1 kb der

30 Nukleotidsequenzen, die natürlicherweise das Nukleinsäuremolekül in der genomischen DNA der Zelle, aus der die Nukleinsäure stammt (bspw. eine *C. glutamicum*-Zelle) flankieren. Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül, wie ein cDNA-Molekül, kann überdies im wesentlichen frei von einem anderen zellulären Material oder

35 Kulturmedium sein, wenn es durch rekombinante Techniken hergestellt wird, oder frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien sein, wenn es chemisch synthetisiert wird.

Ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, bspw. eine Nukleinsäuremolekül mit einer Nukleotidsequenz aus Anhang A oder ein Abschnitt davon, kann mittels molekularbiologischer Standard-Techniken und der hier bereitgestellten Sequenzinformation isoliert werden. Bspw. kann eine *C. glutamicum*-MCT-cDNA aus einer *C. glutamicum*-Bank isoliert werden, indem eine vollständige Sequenz aus 40 Anhang A oder ein Abschnitt davon als Hybridisierungssonde und Standard-Hybridisierungstechniken (wie bspw. beschrieben in Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. Molecular Cloning: A

Laboratory Manual. 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) verwendet werden. Überdies lässt sich ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine vollständige Sequenz aus Anhang A oder ein Abschnitt davon, durch Polymerasekettenreaktion isolieren, wobei die Oligonukleotidprimer, die auf der Basis dieser Sequenz erstellt wurden, verwendet werden (z.B. kann ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine vollständige Sequenz aus Anhang A oder einen Abschnitt davon, durch Polymerasekettenreaktion isoliert werden, indem 5 Oligonukleotidprimer verwendet werden, die auf der Basis dieser gleichen Sequenz aus Anhang A erstellt worden sind). Bspw. lässt sich mRNA aus normalen Endothelzellen isolieren (bspw. durch das Guanidiniumthiocyanat-Extraktionsverfahren von Chirgwin et al. (1979) Biochemistry 18: 5294-5299) und die cDNA kann mittels 10 reverser Transkriptase (bspw. Moloney-MLV-Reverse-Transkriptase, erhältlich bei Gibco/BRL, Bethesda, MD, oder AMV-Reverse-Transkriptase, erhältlich von Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL) hergestellt werden. Synthetische Oligonukleotidprimer für die 15 Amplifizierung via Polymerasekettenreaktion lassen sich auf der Basis einer der in Anhang A gezeigten Nukleotidsequenzen erstellt. Eine erfindungsgemäße Nukleinsäure kann mittels cDNA oder alternativ genomischer DNA als Matrize und geeigneten Oligonukleotidprimern gemäß PCR-Standard-Amplifikationstechniken amplifiziert werden. Die so amplifizierte Nukleinsäure kann in einen 20 geeigneten Vektor kloniert werden und durch DNA-Sequenzanalyse charakterisiert werden. Oligonukleotide, die einer MCT-Nukleotidsequenz entsprechen, können durch Standard-Syntheseverfahren, bspw. mit einem automatischen DNA-Synthesegerät, hergestellt werden.

30

Bei einer bevorzugten Ausführungsform umfasst ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül eine der in Anhang A aufgeführten Nukleotidsequenzen. Die Sequenzen von Anhang A entsprechen den erfindungsgemäßen MCT-cDNAs aus *Corynebacterium glutamicum*. Diese cDNAs umfassen Sequenzen, die MCT-Proteine (d.h. den "codierenden Bereich", der in jeder Sequenz in Anhang A angegeben ist), sowie die 5'- und 3'-untranslatierten Sequenzen, die ebenfalls in Anhang A angegeben sind. Das Nukleinsäuremolekül kann alternativ nur den codierenden Bereich einer der Sequenzen in 35 Anhang A umfassen.

Für erfindungsgemäße Zwecke hat selbstverständlich jede der in Anhang A angegebenen Sequenzen eine RXA- oder RXN-Identifizierungsnummer, wobei hinter der Bezeichnung "RXA" oder "RXN" 5 Ziffern aufgeführt sind (bspw. RXA00001). Jede dieser Sequenzen umfasst bis zu drei Abschnitte: einen stromaufwärts gelegenen 45 5'-Bereich, einen codierenden Bereich, und einen stromabwärts

gelegenen 3'-Bereich. Jeder dieser drei Bereiche ist durch die gleiche RXA- oder RXN-Bezeichnung gekennzeichnet, um Verwirrung zu vermeiden. Die Bezeichnung "eine der Sequenzen in Anhang A" steht für eine der Sequenzen in Anhang A, die sich durch ihre unterschiedlichen RXA- oder RXN-Nummern unterscheiden lassen. Der codierende Bereich jeder Sequenz wird in die entsprechende Aminosäuresequenz translatiert, die in Anhang B angegeben ist. Die Sequenzen in Anhang B werden durch die gleichen RXA- oder RXN-Nummern wie in Anhang A identifiziert, so daß sie sich leicht zuordnen lassen. Bspw. ist die mit RXA00001 bezeichnete Aminosäuresequenz in Anhang B eine Translation des codierenden Bereichs der Nukleotidsequenz des Nukleinsäuremoleküls RXA00001 in Anhang A.

Bei einer Ausführungsform sollen die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle nicht die in Tabelle 2 zusammengestellten umfassen. Eine Sequenz für das dapD-Gen wurde in Wehrmann, A. et al. (1998) J. Bacteriol. 180(12): 3159-3165 veröffentlicht. Die von den Erfindern der vorliegenden Patentanmeldung gewonnene Sequenz ist jedoch erheblich länger als die veröffentlichte Version. Man nimmt an, daß die veröffentlichte Version auf einem inkorrekten Startcodon beruht, und somit nur ein Fragment des eigentlichen codierenden Bereichs ausmacht.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül ein zu einer der in Anhang A gezeigten Nukleotidsequenzen komplementäres Nukleinsäuremolekül oder einen Abschnitt davon, wobei es sich um ein Nukleinsäuremolekül handelt, das zu einer der in Anhang A gezeigten Nukleotidsequenzen hinreichend komplementär ist, daß es mit einer der in Anhang A angegebenen Sequenzen hybridisieren kann, wodurch ein stabiler Duplex entsteht.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz, die mindestens etwa 50-60%, vorzugsweise mindestens etwa 60-70%, stärker bevorzugt mindestens etwa 70-80%, 80-90% oder 90-95% und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 95%, 96%, 97%, 98%, 99% oder noch homologer zu einer in Anhang A angegebenen Nukleotidsequenz oder einem Abschnitt davon ist. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz, die, bspw. unter stringenten Bedingungen, mit einer der in Anhang A gezeigten Nukleotidsequenzen oder einem Abschnitt davon hybridisiert.

45 Das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül kann überdies nur einen Abschnitt des codierenden Bereichs von einer der Sequenzen in Anhang A umfassen, bspw. ein Fragment, das als Sonde oder Primer

oder Fragment verwendet werden kann, welches einen biologisch aktiven Abschnitt eines MCT-Proteins codiert. Die aus der Klonierung der MCT-Gene aus *C. glutamicum* ermittelten Nukleotidsequenzen ermöglichen die Erzeugung von Sonden und Primern, die zur 5 Identifizierung und/oder Klonierung von MCT-Homologa in anderen Zelltypen und Organismen und MCT-Homologa von anderen Corynebakterien oder verwandten Arten ausgelegt sind.. Die Sonde bzw. der Primer umfassen gewöhnlich im wesentlichen gereinigtes Oligonukleotid. Das Oligonukleotid umfaßt gewöhnlich einen Nukleotid-10 sequenzbereich, der unter stringenten Bedingungen an mindestens etwa 12, vorzugsweise etwa 25, stärker bevorzugt etwa 40, 50 oder 75 aufeinanderfolgende Nukleotide eines Sense-Stranges von einer der in Anhang A angegebenen Sequenzen, eines Antisense-Stranges von einer der in Anhang A angegebenen Sequenzen oder natürlich 15 vorkommenden Mutanten davon hybridisiert. Primer auf der Basis einer Nukleotidsequenz aus Anhang A können in PCR-Reaktionen zur Klonierung von MCT-Homologa verwendet werden. Sonden auf der Basis der MCT-Nukleotidsequenzen können zum Nachweisen von Transkripten oder genomischen Sequenzen, die das gleiche oder homologe 20 Proteine codieren, verwendet werden. In bevorzugten Ausführungsformen umfaßt die Sonde zudem eine daran gebundene Markierungsgruppe, bspw. ein Radioisotop, eine fluoreszierende Verbindung, ein Enzym oder einen Enzym-Cofaktor. Diese Sonden können als Teil eines diagnostischen Test-Kits zur Identifizierung von Zellen 25 verwendet werden, die ein MCT-Protein misexprimieren, wie durch Messen einer Menge einer MCT-codierenden Nukleinsäure in einer Zellenprobe, bspw. Messen der MCT-mRNA-Spiegel oder durch Bestimmen, ob ein genomisches MCT-Gen mutiert oder deletiert ist.

30 Bei einer Ausführungsform codiert das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül ein Protein oder einen Abschnitt davon, der eine Aminosäuresequenz umfaßt, die hinreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz von Anhang B ist, daß das Protein oder ein Abschnitt davon weiterhin am Metabolismus von Verbindungen, die für den 35 Aufbau der Zellmembranen in *C. glutamicum* notwendig sind, oder am Transport der Moleküle über diese Membranen beteiligt sein kann. Wie hier verwendet, betrifft der Begriff "hinreichend homolog" Proteine oder Abschnitte davon, deren Aminosäuresequenzen eine minimale Anzahl identischer oder äquivalenter Aminosäurereste 40 (bspw. ein Aminosäurerest mit einer ähnlichen Seitenkette wie ein Aminosäurerest in einer der Sequenzen von Anhang B) zu einer Aminosäuresequenz aus Anhang B aufweisen, so daß das Protein oder ein Abschnitt davon weiterhin am Metabolismus von Verbindungen, die für den Aufbau der Zellmembranen in *C. glutamicum* notwendig 45 sind, oder am Transport der Moleküle über diese Membranen beteiligt sein kann. Proteinbestandteile dieser Stoffwechselwege für Membrankomponenten oder Membrantransportsysteme, wie hier be-

schrieben, können eine Rolle bei der Produktion und Sekretion von einer oder mehreren Feinchemikalien spielen. Beispiele dieser Aktivitäten sind ebenfalls hier beschrieben. Somit betrifft die "Funktion eines MCT-Proteins" entweder direkt oder indirekt die 5 Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von einer oder mehreren Feinchemikalien. In Tabelle 1 sind Beispiele der MCT-Proteinaktivitäten angegeben.

Bei einer weiteren Ausführungsform ist das Protein mindestens 10 etwa 50-60%, vorzugsweise mindestens etwa 60-70%, stärker bevorzugt mindestens etwa 70-80%, 80-90%, 90-95% und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 96%, 97%, 98%, 99% oder noch homologer zu einer vollständigen Aminosäuresequenz in Anhang B.

15 Abschnitte von Proteinen, die von den erfindungsgemäßen MCT-Nukleinsäuremolekülen codiert werden, sind vorzugsweise biologisch aktive Abschnitte von einem der MCT-Proteine. Der Begriff "biologisch aktiver Abschnitt eines MCT-Proteins", wie er hier verwendet wird, soll einen Abschnitt, bspw. eine Domäne oder ein 20 Motiv, eines MCT-Proteins umfassen, die/das am Metabolismus von Verbindungen, die für den Aufbau der Zellmembranen in *C. glutamicum* notwendig sind, oder am Transport von Molekülen über diese Membranen beteiligt sein kann, oder eine in Tabelle 1 angegebene Aktivität aufweist. Zur Bestimmung, ob ein MCT-Protein oder ein 25 biologisch aktiver Abschnitt davon am Metabolismus von Verbindungen, die für den Aufbau der Zellmembranen in *C. glutamicum* notwendig sind, oder am Transport von Molekülen über diese Membranen beteiligt sein kann, kann ein Test der enzymatischen Aktivität durchgeführt werden. Diese Testverfahren, wie eingehend beschrieben 30 in Beispiel 8 des Beispielteils, sind dem Fachmann geläufig.

Zusätzliche Nukleinsäurefragmente, die biologisch aktive Abschnitte eines MCT-Proteins codieren, lassen sich durch Isolieren eines Abschnitts von einer der Sequenzen in Anhang B, Exprimieren 35 des codierten Abschnitt des MCT-Proteins oder -Peptides (z.B. durch rekombinante Expression *in vitro*) und Bestimmen der Aktivität des codierten Abschnittes des MCT-Proteins oder Peptides herstellen.

40 Die Erfindung umfaßt zudem Nukleinsäuremoleküle, die sich von einer der in Anhang A gezeigten Nukleotidsequenzen (und Abschnitten davon) aufgrund des degenerierten genetischen Codes unterscheiden und somit das gleiche MCT-Protein codieren wie dasjenige, das von den in Anhang A gezeigten Nukleotidsequenzen codiert wird. In einer 45 anderen Ausführungsform hat ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz, die ein Protein mit einer in Anhang B gezeigten Aminosäuresequenz codiert. In einer

weiteren Ausführungsform codiert das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül ein *C. glutamicum*-Vollängenprotein, das zu einer Aminosäuresequenz aus Anhang B (codiert von einem in Anhang A gezeigten offenen Leseraster) im wesentlichen homolog ist.

5

Zusätzlich zu den in Anhang A gezeigten *C. glutamicum*-MCT-Nukleotidsequenzen, geht der Fachmann davon aus, daß DNA-Sequenzpolymorphismen, die zu Änderungen in den Aminosäuresequenzen von MCT-Proteinen führen, innerhalb einer Population (bspw. der *C. glutamicum*-Population) existieren können. Diese genetischen Polymorphismen im MCT-Gen können zwischen Individuen innerhalb einer Population aufgrund der natürlichen Variation existieren. Wie hier verwendet, bedeuten die Begriffe "Gen" und "rekombinantes Gen" Nukleinsäuremoleküle mit einem offenen Leseraster, das ein MCT-Protein, vorzugsweise *C. glutamicum*-MCT-Protein codiert. Diese natürlichen Variationen bewirken üblicherweise eine Varianz von 1-5% in der Nukleotidsequenz des MCT-Gens. Sämtliche Nukleotidvariationen und daraus resultierenden Aminosäurepolymorphismen in MCT, die das Ergebnis natürlicher Variation sind und die funktionelle Aktivität von MCT-Proteinen nicht verändern, sollen im Umfang der Erfindung liegen.

Nukleinsäuremoleküle, die den natürlichen Varianten entsprechen, und Nicht-*C. glutamicum*-Homologa der erfindungsgemäßen *C. glutamicum*-MCT-cDNA können auf der Grundlage ihrer Homologie zur hier offenbarten *C. glutamicum*-MCT-Nukleinsäure mit der *C. glutamicum*-cDNA oder einem Abschnitt davon als Hybridisierungssonde gemäß Standard-Hybridisierungstechniken unter stringenten Hybridisierungsbedingungen isoliert werden. In einer anderen Ausführungsform ist ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül mindestens 15 Nukleotide lang und hybridisiert unter stringenten Bedingungen mit dem Nukleinsäuremolekül, das eine Nukleotidsequenz aus Anhang A umfaßt. In anderen Ausführungsformen ist die Nukleinsäure mindestens 30, 50, 100, 250 Nukleotide lang oder länger. Der Begriff "hybridisiert unter stringenten Bedingungen", wie er hier verwendet wird, soll Hybridisierungs- und Waschbedingungen beschreiben, unter denen Nukleotidsequenzen, die mindestens 60% homolog zueinander sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Die Bedingungen sind vorzugsweise derart, daß Sequenzen, die mindestens etwa 65%, stärker bevorzugt mindestens etwa 70% und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 75% oder stärker zueinander homolog sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Diese stringenten Bedingungen sind dem Fachmann bekannt und lassen sich in Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY. (1989), 6.3.1-6.3.6. finden. Ein bevorzugtes, nicht-einschränkendes Beispiel für stringenten Hybridisierungsbedingungen ist eine Hybridisierung in

6x Natriumchlorid/Natriumcitrat (SSC) bei etwa 45°C, gefolgt von einem oder mehreren Waschschriften in 0,2x SSC, 0,1% SDS bei 50-65°C. Ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül, das unter stringenten Bedingungen an eine Sequenz aus Anhang A hybridisiert, entspricht vorzugsweise einem natürlich vorkommenden Nukleinsäuremolekül. Wie hier verwendet betrifft ein "natürlich vorkommendes" Nukleinsäuremolekül ein RNA- oder DNA-Molekül, mit einer Nukleotidsequenz, die in der Natur vorkommt (bspw. ein natürliches Protein codiert). Bei einer Ausführungsform codiert 10 die Nukleinsäure ein natürlich vorkommendes *C. glutamicum*-MCT-Protein.

Zusätzlich zu natürlich vorkommenden Varianten der MCT-Sequenz, die in der Population existieren können, ist der Fachmann sich 15 ebenfalls dessen bewußt, daß Änderungen durch Mutation in einer Nukleotidsequenz von Anhang A eingebracht werden können, was zur Änderung der Aminosäuresequenz des codierten MCT-Proteins führt, ohne daß die Funktionsfähigkeit des MCT-Proteins beeinträchtigt wird. Bspw. lassen sich Nukleotidsusbtitutionen, die an "nicht- 20 essentiellen" Aminosäureresten zu Aminosäuresubstitutionen führen, in einer Sequenz von Anhang A herstellen. Ein "nicht-essentieller" Aminosäurerest lässt sich in einer Wildtypsequenz von einem der MCT-Proteine (Anhang B) verändern, ohne daß die Aktivität des MCT-Proteins verändert wird, wohingegen ein "essentieller" 25 Aminosäurerest für die MCT-Proteinaktivität erforderlich ist. Andere Aminosäurereste jedoch (bspw. nicht-konservierte oder lediglich semikonservierte Aminosäurereste in der Domäne mit MCT-Aktivität) können für die Aktivität nicht essentiell sein und lassen sich somit wahrscheinlich verändern, ohne daß die MCT-Aktivität 30 verändert wird.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Nukleinsäuremoleküle, die MCT-Proteine codieren, die veränderte Aminosäurereste enthalten, die für die MCT-Aktivität nicht-essentiell sind. Diese MCT- 35 Proteine unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz von einer Sequenz in Anhang B und behalten zumindest eine der hier beschriebenen MCT-Aktivitäten. Das isolierte Nukleinsäuremolekül umfaßt bei einer Ausführungsform eine Nukleotidsequenz, die ein Protein codiert, das eine Aminosäuresequenz umfaßt, die mindestens 40 etwa 50% Homologie zu einer Aminosäuresequenz aus Anhang B aufweist, und am Metabolismus von Verbindungen, die für den Aufbau der Zellmembranen in *C. glutamicum* notwendig sind, oder am Transport von Molekülen über diese Membranen beteiligt sein kann, oder eine oder mehrere der in Tabelle 1 aufgeführten Aktivitäten 45 besitzt. Das von dem Nukleinsäuremolekül codierte Protein weist vorzugsweise mindestens etwa 50-60%, stärker bevorzugt mindestens etwa 60-70%, noch stärker bevorzugt mindestens etwa 70-80%,

80-90%, 90-95%, und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 96%, 97%, 98% oder 99% Homologie zu einer der Sequenzen in Anhang B auf.

5 Zur Bestimmung der prozentualen Homologie von zwei Aminosäuresequenzen (bspw. einer der Sequenzen aus Anhang B und einer mutierten Form davon) oder von zwei Nukleinsäuren, werden die Sequenzen für optimale Vergleichszwecke untereinander geschrieben (bspw. können Lücken in die Sequenz eines Proteins oder einer Nuklein-
10 säure eingefügt werden, damit ein optimales Alignment mit dem anderen Protein oder der anderen Nukleinsäure erzeugt wird). Die Aminosäurereste oder die Nukleotide werden dann an den entsprechenden Aminosäure- oder Nukleotidstellen miteinander verglichen. Wenn eine Position in einer Sequenz (bspw. eine der Sequenzen von
15 Anhang B) vom gleichen Aminosäurerest oder Nukleotid belegt wird, wie an der entsprechenden Stelle in der anderen Sequenz (bspw. eine mutierte Form der aus Anhang B ausgewählten Sequenz), dann sind die Moleküle an dieser Stelle homolog (d.h. der hier verwendete Begriff Aminosäure- oder Nukleinsäure- "Homologie" ist äquivalent zu Aminosäure- oder Nukleinsäure- "Identität"). Die prozentuale Homologie zwischen den beiden Sequenzen ist eine Funktion der Anzahl der identischen Stellen in allen Sequenzen (d.h. % Homologie = Anzahl der identischen Stellen/Gesamtanzahl der Positionen x 100).
25

Ein isoliertes Nukleinsäuremolekül, das ein MCT-Protein codiert, das zu einer Proteinsequenz aus Anhang B homolog ist, kann durch Einbringen von einer oder mehreren Nukleotidsubstitutionen, -additionen oder -deletionen in eine Nukleotidsequenz aus Anhang
30 A erzeugt werden, so daß eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen, -additionen oder -deletionen in das codierte Protein eingebracht werden. Die Mutationen können in eine der Sequenzen aus Anhang A durch Standard-Techniken eingebracht werden, wie stellengerichtete Mutagenese und PCR-vermittelte Mutagenese. Vor-
35 zugsweise werden konservative Aminosäuresubstitutionen an einer oder mehreren der vorhergesagten nicht-essentiellen Aminosäureresten eingeführt. Bei einer "konservativen Aminosäuresubstitution" wird der Aminosäurerest durch einen Aminosäurerest mit einer ähnlichen Seitenkette ausgetauscht. Im Fachgebiet sind Familien
40 von Aminosäureresten mit ähnlichen Seitenketten definiert worden. Diese Familien umfassen Aminosäuren mit basischen Seitenketten (z.B. Lysin, Arginin, Histidin), sauren Seitenketten (z.B. Asparaginsäure, Glutaminsäure), ungeladenen polaren Seitenketten (z.B. Glycin, Asparagin, Glutamin, Serin, Threonin, Tyrosin,
45 Cystein), nicht-polaren Seitenketten, (bspw. Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Phenylalanin, Methionin, Tryptophan), beta-verzweigten Seitenketten (z.B. Threonin, Valin, Isoleucin)

und aromatischen Seitenketten (z.B. Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, Histidin). Ein vorhergesagter nicht-essentieller Aminosäurerest in einem MCT-Protein wird somit vorzugsweise durch einen anderen Aminosäurerest der gleichen Seitenkettenfamilie ausgetauscht. In einer weiteren Ausführungsform können die Mutationen alternativ zufallsgemäß über die gesamte oder einen Teil der MCT-codierenden Sequenz eingebracht werden, bspw. durch Sättigungsmutagenese, und die resultierenden Mutanten können auf die hier beschriebene MCT-Aktivität untersucht werden, um Mutanten zu identifizieren, die eine MCT-Aktivität beibehalten. Nach der Mutagenese von einer der Sequenzen aus Anhang A kann das codierte Protein rekombinant exprimiert werden, und die Aktivität des Proteins kann bspw. mit den hier beschriebenen Tests (siehe Beispiel 8 des Beispielteils) bestimmt werden.

15 Zusätzlich zu den Nukleinsäuremolekülen, die die vorstehend beschriebenen MCT-Proteine codieren, betrifft ein weiterer Aspekt der Erfindung isolierte Nukleinsäuremoleküle, die antisense dazu sind. Eine "Antisense"-Nukleinsäure umfaßt eine Nukleotidsequenz, 20 die zu einer "Sense"-Nukleinsäure, welche ein Protein codiert, komplementär ist, bspw. komplementär zum codierenden Strang eines doppelsträngigen cDNA-Moleküls oder komplementär zu einer mRNA-Sequenz. Eine Antisense-Nukleinsäure kann folglich über Wasserstoffbrückenbindungen an eine Sense-Nukleinsäure binden. Die 25 Antisense-Nukleinsäure kann zum gesamten MCT-codierenden Strang oder nur zu einem Abschnitt davon komplementär sein. Bei einer Ausführungsform ist ein Antisense-Nukleinsäuremolekül antisense zu einem "codierenden Bereich" des codierenden Stranges einer Nukleotidsequenz, die ein MCT-Protein codiert. Der Begriff "codierender Bereich" betrifft den Bereich der Nukleotidsequenz, der 30 Codons umfaßt, die in Aminosäurereste translatiert werden (bspw. umfaßt der gesamte codierende Bereich von SEQ.-ID. RXA00001 die Nukleotide 1 bis 1128). Bei einer weiteren Ausführungsform ist das Antisense-Nukleinsäuremolekül antisense zu einem "nicht-codierenden Bereich" des codierenden Stranges einer Nukleotidsequenz, die MCT codiert. Der Begriff "nicht-codierender Bereich" 35 betrifft 5'- und 3'-Sequenzen, die den codierenden Bereich flankieren und nicht in Aminosäuren translatiert werden (d.h. die auch als 5'- und 3'-untranslatierte Bereiche bezeichnet werden). 40 Bei den hier offenbarten Sequenzen des codierenden Stranges, die das MCT codieren (bspw. die Sequenzen aus Anhang A), können die erfindungsgemäßen Antisense-Nukleinsäuren gemäß der Regeln der Watson-Crick-Basenpaarung ausgestaltet werden. Das Antisense-Nukleinsäuremolekül kann zum gesamten codierenden Bereich von 45 MCT-mRNA komplementär sein, ist aber stärker bevorzugt ein Oligonukleotid, das zu lediglich einem Abschnitt des codierenden oder

nicht-codierenden Bereichs der MCT-mRNA antisense ist. Das Anti-sense-Oligonukleotid kann bspw. zum Bereich, der die Translationsstartstelle von MCT-mRNA umgibt, komplementär sein. Ein Anti-sense-Oligonukleotid kann bspw. etwa 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 5 40, 45 oder 50 Nukleotide lang sein. Eine erfindungsgemäße Anti-sense-Nukleinsäure kann mittels chemischer Synthese und enzymatischer Ligationsreaktionen mittels im Fachgebiet bekannter Verfahren konstruiert werden. Eine Antisense-Nukleinsäure (bspw. ein Antisense-Oligonukleotid) kann bspw. chemisch synthetisiert werden, wobei natürlich vorkommende Nukleotide oder verschieden 10 modifizierte Nukleotide verwendet werden, die so aufgebaut sind, daß sie die biologische Stabilität der Moleküle erhöhen, oder die physikalische Stabilität des Duplexes erhöhen, der zwischen der Antisense- und Sense-Nukleinsäure entstanden ist. Bspw. können 15 Phosphorthioat-Derivate und acridinsubstituierte Nukleotide verwendet werden. Beispiele modifizierter Nukleotide, die zur Erzeugung der Antisense-Nukleinsäure verwendet werden können, sind u.a. 5-Fluoruracil, 5-Bromuracil, 5-Chloruracil, 5-Ioduracil, Hypoxanthin, Xanthin, 4-Acetylcytosin, 5-(Carboxyhydroxymethyl)uracil, 5-Carboxymethylaminomethyl-2-thiouridin, 5-Carboxymethylaminomethyluracil, Dihydrouracil, Beta-D-Galactosylqueosin, Inosin, N6-Isopentenyladenin, 1-Methylguanin, 1-Methylinosin, 2,2-Dimethylguanin, 2-Methyladenin, 2-Methylguanin, 3-Methylcytosin, 5-Methylcytosin, N6-Adenin, 7-Methylguanin, 5-Methylamino-25 methyluracil, 5-Methoxyaminomethyl-2-thiouracil, Beta-D-Mannosylqueosin, 5'-Methoxycarboxymethyluracil, 5-Methoxyuracil, 2-Methylthio-N6-isopentenyladenin, Uracil-5-oxyessigsäure (v), Wybutoxosin, Pseudouracil, Queosin, 2-Thiocytosin, 5-Methyl-2-thiouracil, 2-Thiouracil, 4-Thiouracil, 5-Methyluracil, 30 Uracil-5-oxyessigsäuremethyleneester, Uracil-5-oxyessigsäure (v), 5-Methyl-2-thiouracil, 3-(3-Amino-3-N-2-carboxypropyl)uracil, (acp3)w und 2,6-Diaminopurin. Die Antisense-Nukleinsäure kann ersatzweise biologisch hergestellt werden, indem ein Expressionsvektor verwendet wird, in den eine Nukleinsäure in Antisense-35 Richtung subkloniert worden ist (d.h. RNA, die von der einge-brachten Nukleinsäure transkribiert wird, ist zu einer Ziel-nukleinsäure von Interesse in Antisense-Richtung orientiert, was im nachstehenden Unterabschnitt weiter beschrieben ist).

40 Die erfindungsgemäßen Antisense-Nukleinsäuremoleküle werden üblicherweise an eine Zelle verabreicht oder in situ erzeugt, so daß sie mit der zellulären mRNA und/oder der genomischen DNA, die ein MCT-Protein codiert, hybridisieren oder daran binden, so daß die Expression des Proteins, bspw. durch Hemmung der Transkription 45 und/oder Translation, gehemmt wird. Die Hybridisierung kann durch herkömmliche Nukleotid-Komplementarität unter Bildung eines sta-bilen Duplexes oder bspw. im Fall eines Antisense-Nukleinsäure-

moleküls, das DNA-Duplices bindet, durch spezifische Wechselwirkungen in der großen Furche der Doppelhelix erfolgen. Das Antisense-Molekül kann so modifiziert werden, daß es spezifisch an einen Rezeptor oder an ein Antigen bindet, das auf einer ausgewählten Zelloberfläche exprimiert wird, bspw. durch Verknüpfen des Antisense-Nukleinsäuremoleküls an ein Peptid oder einen Antikörper, der an einen Zelloberflächenrezeptor oder Antigen bindet. Das Antisense-Nukleinsäuremolekül kann ebenfalls an Zellen verabreicht werden, wobei die hier beschriebenen Vektoren verwendet werden. Zur Erzielung hinreichender intrazellulärer Konzentrationen der Antisense-Moleküle sind Vektorkonstrukte, in denen sich das Antisense-Nukleinsäuremolekül unter der Kontrolle eines starken Pol-II- oder Pol-III-Promotors befindet, bevorzugt.

15 In einer weiteren Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäuremolekül ein α -anomeres Nukleinsäuremolekül. Ein α -anomeres Nukleinsäuremolekül bildet spezifische doppelsträngige Hybride mit komplementärer RNA, wobei die Stränge im Gegensatz zu gewöhnlichen β -Einheiten parallel zueinander verlaufen. (Gaultier et al., (1987) Nucleic Acids Res. 15:6625-6641). Das Antisense-Nukleinsäuremolekül kann zudem ein 2'-o-Methylribonukleotid (Inoue et al., (1987) Nucleic Acids Res. 15:6131-6148) oder ein chimäres RNA-DNA-Analogon (Inoue et al. (1987) FEBS Lett. 215:327-330) umfassen.

25 In einer weiteren Ausführungsform ist eine erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäure ein Ribozym. Ribozyme sind katalytische RNA-Moleküle mit Ribonukleaseaktivität, die eine einzelsträngige Nukleinsäure, wie eine mRNA, spalten können, zu der sie einen komplementären Bereich haben. Somit können Ribozyme (z.B. Hammerhead-Ribozyme (beschrieben in Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591)) zur katalytischen Spaltung von MCT-mRNA-Transkripten verwendet werden, um dadurch die Translation der MCT-mRNA zu hemmen. Ein Ribozym mit Spezifität für eine MCT-codierende Nukleinsäure kann auf der Basis der Nukleotidsequenz einer hier offenbarten MCT-cDNA (d.h. RXA00001 in Anhang A) aufgebaut werden. Bspw. kann ein Derivat einer Tetrahymena-L-19-IVS-RNA konstruiert werden, wobei die Nukleotidsequenz der aktiven Stelle komplementär zur Nukleotidsequenz ist, die in einer MCT-codierenden mRNA gespalten werden soll. S. bspw. Cech et al., US-Patent Nr. 4 987 071 und Cech et al., US-Patent Nr. 5 116 742. Alternativ kann MCT-mRNA zur Selektion einer katalytischen RNA mit spezifischer Ribonukleaseaktivität aus einem Pool von RNA-Molekülen verwendet werden. Siehe bspw. Bartel, D., und Szostak, J.W. (1993) Science 261: 1411-1418.

Die MCT-Genexpression läßt sich alternativ hemmen, indem Nukleotidsequenzen, die komplementär zum regulatorischen Bereich einer MCT-Nukleotidsequenz sind (bspw. ein MCT-Promotor und/oder -Enhancer) so dirigiert werden, daß Triple-Helixstrukturen gebildet werden, die die Transkription eines MCT-Gens in Ziel-Zellen verhindern. Siehe allgemein Helene, C. (1991) Anticancer Drug Res. 6(6) 569-584; Helene, C. et al., (1992) Ann. N. Y. Acad. Sci. 660: 27-36; und Maher, L.J. (1992) Bioassays 14(12) 807-815.

10 B. Rekombinante Expressionsvektoren und Wirtszellen

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Vektoren, vorzugsweise Expressionsvektoren, die eine Nukleinsäure enthalten, die ein MCT-Protein (oder einen Abschnitt davon) codieren. Wie hier verwendet betrifft der Begriff "Vektor" ein Nukleinsäuremolekül, das eine andere Nukleinsäure transportieren kann, an welche es gebunden ist. Ein Vektortyp ist ein "Plasmid", was für eine zirkuläre doppelsträngige DNA-Schleife steht, in die zusätzlichen DNA-Segmente ligiert werden können. Ein weiterer Vektortyp ist ein viraler Vektor, wobei zusätzliche DNA-Segmente in das virale Genom ligiert werden können. Bestimmte Vektoren können in einer Wirtszelle, in die sie eingebracht worden sind, autonom replizieren (bspw. Bakterienvektoren, mit bakteriellem Replikationsursprung und episomale Säugetiervektoren). Andere Vektoren (z.B. nicht-episomale Säugetiervektoren) werden in das Genom einer Wirtszelle beim Einbringen in die Wirtszelle integriert und dadurch zusammen mit dem Wirtsgenom repliziert. Zudem können bestimmte Vektoren die Expression von Genen, mit denen sie funktionsfähig verbunden sind, steuern. Diese Vektoren werden als "Expressionsvektoren" bezeichnet. Gewöhnlich haben die Expressionsvektoren, die bei DNA-Rekombinationstechniken verwendet werden, die Form von Plasmiden. In der vorliegenden Beschreibung können "Plasmid" und "Vektor" austauschbar verwendet werden, da das Plasmid die am häufigsten verwendete Vektorform ist. Die Erfindung soll diese anderen Expressionsvektorformen, wie virale Vektoren (bspw. replikationsdefiziente Retroviren, Adenoviren und adenoverwandte Viren), die ähnliche Funktionen ausüben, umfassen.

Der erfindungsgemäße rekombinante Expressionsvektor umfaßt eine erfindungsgemäße Nukleinsäure in einer Form, die sich zur Expression der Nukleinsäure in einer Wirtszelle eignet, was bedeutet, daß die rekombinanten Expressionsvektoren eine oder mehrere regulatorische Sequenzen, ausgewählt auf der Basis der zur Expression zu verwendenden Wirtszellen, die mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz funktionsfähig verbunden ist, umfaßt. In einem rekombinanten Expressionsvektor bedeutet "funktionsfähig verbunden", daß die Nukleotidsequenz von Interesse derart an die

regulatorische(n) Sequenz(en) gebunden ist, daß die Expression der Nukleotidsequenz möglich ist (bspw. in einem In-vitro-Transkriptions-/Translationssystem oder in einer Wirtszelle, wenn der Vektor in die Wirtszelle eingebracht ist). Der Begriff 5 "regulatorische Sequenz" soll Promotoren, Enhancer und andere Expressionskontrollelemente (bspw. Polyadenylierungssignale) umfassen. Diese regulatorischen Sequenzen sind bspw beschrieben in Goeddel: Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Regulatorische Sequenzen 10 umfassen solche, die die konstitutive Expression einer Nukleotidsequenz in vielen Wirtszelltypen steuern, und solche, die die direkte Expression der Nukleotidsequenz nur in bestimmten Wirtszellen steuern. Der Fachmann ist sich dessen bewußt, daß die Gestaltung eines Expressionsvektors von Faktoren abhängen kann, 15 wie der Wahl der zu transformierenden Wirtszelle, dem Ausmaß der Expression des gewünschten Proteins usw. Die erfindungsgemäß Expressionsvektoren können in die Wirtszellen eingebracht werden, so daß dadurch Proteine oder Peptide, einschließlich Fusionsproteinen oder -peptiden, die von den Nukleinsäuren, wie hier 20 beschrieben, codiert werden, hergestellt werden (bspw. MCT-Proteine, mutierte Formen von MCT-Proteinen, Fusionsproteine, usw.).

Die erfindungsgemäß rekombinanten Expressionsvektoren können 25 zur Expression von MCT-Proteinen in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen ausgestaltet sein. Bspw. können MCT-Gene in bakteriellen Zellen, wie *C. glutamicum*, Insektenzellen (mit Baculovirus-Expressionsvektoren), Hefe- und anderen Pilzzellen (siehe Romanos, M.A. et al. (1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", Yeast 8: 423-488; van den Hondel, C.A.M.J.J. et 30 al. (1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi" in: More Gene Manipulations in Fungi, J.W. Bennet & L.L. Lasure, Hrsg., S. 396-428: Academic Press: San Diego; und van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi. in: Applied Molecular Genetics 35 of Fungi, Peberdy, J.F. et al., Hrsg, S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge), Algen- und vielzelligen Pflanzenzellen (siehe Schmidt, R. und Willmitzer, L. (1988) "High efficiency *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* leaf and cotyledon explants" Plant Cell 40 Rep.: 583-586) oder Säugetierzellen exprimiert werden. Geeignete Wirtszellen werden weiter erörtert in Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Der rekombinante Expressionsvektor kann alternativ, bspw. mit T7-Promotorregulatorischen Sequenzen und T7-Polymerase, 45 in vitro transkribiert und translatiert werden.

Die Expression von Proteinen in Prokaryonten erfolgt meist mit Vektoren, die konstitutive oder induzierbare Promotoren enthalten, die die Expression von Fusions- oder Nicht-Fusionsproteinen steuern. Fusionsvektoren steuern eine Reihe von Aminosäuren zu einem darin codierten Protein, gewöhnlich am Aminoterminal des rekombinanten Proteins, bei. Diese Fusionsvektoren haben gewöhnlich drei Aufgaben: 1) die Verstärkung der Expression von rekombinantem Protein; 2) die Erhöhung der Löslichkeit des rekombinanten Proteins; und 3) die Unterstützung der Reinigung des rekombinanten Proteins durch Wirkung als Ligand bei der Affinitätsreinigung. Bei Fusions-Expressionsvektoren wird oft eine proteolytische Spaltstelle an der Verbindungsstelle der Fusionseinheit und des rekombinanten Proteins eingebracht, so daß die Trennung des rekombinanten Proteins von der Fusionseinheit nach der Reinigung des Fusionsproteins möglich ist. Diese Enzyme und ihre entsprechenden Erkennungssequenzen umfassen Faktor Xa, Thrombin und Enterokinase.

Übliche Fusionsexpressionsvektoren umfassen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. und Johnson, K.S. (1988) Gene 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) und pRIT 5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), bei denen Glutathion-S-Transferase (GST), Maltose E-bindendes Protein bzw. Protein A an das rekombinante Zielprotein fusioniert wird. Bei einer Ausführungsform ist die codierende Sequenz des MCT-Proteins in einen pGEX-Expressionsvektor kloniert, so daß ein Vektor erzeugt wird, der ein Fusionsprotein codiert, umfassend vom N-Terminus zum C-Terminus, GST - Thrombin-Spaltstelle - X-Protein. Das Fusionsprotein kann durch Affinitätschromatographie mittels Glutathion-Agarose-Harz ge-
reinigt werden. Das rekombinante MCT-Protein, das nicht mit GST fusioniert ist, kann durch Spaltung des Fusionsproteins mit Thrombin gewonnen werden.

Beispiele geeigneter induzierbarer Nicht-Fusions-Expressionsvektoren aus *E. coli* umfassen pTrc (Amann et al., (1988) Gene 69: 301 - 315) und pET 11d (Studier et al. Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60-89). Die Zielgenexpression aus dem pTrc-Vektor beruht auf der Transkription durch Wirts-RNA-Polymerase von einem Hybrid-trp-lac-Fusionspromotor. Die Zielgenexpression aus dem pET11d-Vektor beruht auf der Transkription von einem T7-gn10-lac-Fusions-Promotor, die von einer coexprimierten viralen RNA-Polymerase (T7 gn1) vermittelt wird. Diese virale Polymerase wird von den Wirtsstämmen BL 21 (DE3) oder HMS174 (DE3) von einem residenten λ -Prophagen geliefert, der ein T7

gn1-Gen unter der Transkriptionskontrolle des lacUV 5-Promotors birgt.

Eine Strategie zur Maximierung der Expression des rekombinanten Proteins ist die Expression des Proteins in einem Wirtsbakterium, dessen Fähigkeit zur proteolytischen Spaltung des rekombinanten Proteins gestört ist (Gottesman, S. Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 119-128). Eine weitere Strategie ist die Veränderung der Nukleinsäuresequenz der in einen Expressionsvektor zu inserierenden Nukleinsäure, so daß die einzelnen Codons für jede Aminosäure diejenigen sind, die vorzugsweise in einem zur Expression ausgewählten Bakterium, wie *C. glutamicum*, verwendet werden (Wada et al. (1992) Nucleic Acids Res. 20: 2111 - 2118). Diese Veränderung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen erfolgt durch Standard-DNA-Synthesetechniken.

Bei einer weiteren Ausführungsform ist der MCT-Proteinexpressionsvektor ein Hefe-Expressionsvektor. Beispiele für Vektoren zur Expression in der Hefe *S. cerevisiae* umfassen pYEpSec1 (Baldari et al., (1987) Embo J. 6: 229-234), pMFa (Kurjan und Herskowitz (1982) Cell 30: 933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) Gene 54: 113 - 123) sowie pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren und Verfahren zur Konstruktion von Vektoren, die sich zur Verwendung in anderen Pilzen, wie filamentösen Pilzen, eignen, umfassen diejenigen, die eingehend beschrieben sind in: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: Applied Molecular Genetics of fungi, J.F. Peberdy et al., 30 Hrsg., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.

Alternativ können die erfindungsgemäßen MCT-Proteine in Insektenzellen unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren exprimiert werden. Baculovirus-Vektoren, die zur Expression von Proteinen in gezüchteten Insektenzellen (bspw. Sf9-Zellen) verfügbar sind, umfassen die pAc-Reihe (Smith et al., (1983) Mol. Cell Biol. 3: 2156-2165) und die pVL-Reihe (Lucklow und Summers (1989) Virology 170: 31-39).

40 In einer weiteren Ausführungsform können die erfindungsgemäßen MCT-Proteine in einzelligen Pflanzenzellen (wie Algen) oder in Pflanzenzellen höherer Pflanzen (bspw. Spermatophyten, wie Feldfrüchte) exprimiert werden. Beispiele für Pflanzen-Expressionsvektoren umfassen solche, die eingehend beschrieben sind in: 45 Becker, D., Kemper, E., Schell, J. und Masterson, R. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", Plant Mol. Biol. 20: 1195-1197; und Bevan, M.W.

(1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation",
Nucl. Acids Res. 12: 8711-8721.

In einer weiteren Ausführungsform wird eine erfindungsgemäße
5 Nukleinsäure in Säugetierzellen mit einem Säugetier-Expressions-
vektor exprimiert.. Beispiele für Säugetier-Expressionsvektoren
umfassen pCDM8 (Seed, B. (1987) Nature 329:840) und pMT2PC (Kauf-
man et al. (1987) EMBO J. 6: 187-195). Bei der Verwendung in
Säugetierzellen werden die Kontrollfunktionen des Expressions-
10 vektors oft von viralen regulatorischen Elementen bereitgestellt.
Gemeinhin verwendete Promotoren stammen bspw. aus Polyoma, Adeno-
virus2, Cytomegalievirus und Simian Virus 40. Für weitere geeig-
nete Expressionssysteme für prokaryotische und eukaryotische
Zellen, siehe die Kapitel 16 und 17 aus Sambrook, J., Fritsch,
15 E.F. und Maniatis, T., Molecular cloning: A Laboratory Manual,
2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor
Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Bei einer weiteren Ausführungsform kann der rekombinante Säuge-
20 tier-Expressionsvektor die Expression der Nukleinsäure vorzugs-
weise in einem bestimmten Zelltyp bewirken (bspw. werden gewebe-
spezifische regulatorische Elemente zur Expression der Nuklein-
säure verwendet). Gewebespezifische regulatorische Elemente sind
im Fachgebiet bekannt. Nicht-einschränkende Beispiele für geei-
25 gnete gewebespezifische Promotoren umfassen den Albuminpromotor
(leberspezifisch; Pinkert et al. (1987) Genes Dev. 1: 268-277),
lymphoid-spezifische Promotoren (Calame und Eaton (1988) Adv.
Immunol. 43: 235-275), insbesondere Promotoren von T-Zellrezepto-
ren (Winoto und Baltimore (1989) EMBO J. 8: 729-733) und Immun-
30 globulinen (Banerji et al. (1983) Cell 33: 729-740; Queen und
Baltimore (1983) Cell 33: 741-748), neuronspezifische Promotoren
(bspw. Neurofilament-Promotor; Byrne und Ruddle (1989) PNAS 86:
5473-5477), pankreaspezifische Promotoren (Edlund et al., (1985)
Science 230: 912-916) und milchdrüsenspezifische Promotoren
35 (bspw. Milchserum-Promotor; US-Patent Nr. 4 873 316 und europäi-
sche Patentanmeldungsveröffentlichung Nr. 264 166). Entwicklungs-
regulierte Promotoren sind ebenfalls umfaßt, bspw. die Maus-hox-
Promotoren (Kessel und Gruss (1990) Science 249: 374-379) und der
α-Fetoprotein-Promotor (Campes und Tilghman (1989) Genes Dev. 3:
40 537-546).

Die Erfindung stellt zudem einen rekombinanten Expressionsvektor
bereit, umfassend ein erfindungsgemäßes DNA Molekül, das in
Antisense-Richtung in den Expressionsvektor kloniert ist. Dies
45 bedeutet, daß das DNA-Molekül derart mit einer regulatorischen
Sequenz funktionsfähig verbunden ist, daß die Expression (durch
Transkription des DNA-Moleküls) eines RNA-Moleküls, das zur MCT-

mRNA antisense ist, möglich ist. Es können regulatorische Sequenzen ausgewählt werden, die funktionsfähig an eine in Antisense-Richtung klonierte Nukleinsäure gebunden sind und die die kontinuierliche Expression des Antisense-RNA-Moleküls in einer Vielzahl von Zelltypen steuern, bspw. können virale Promotoren und/oder Enhancer oder regulatorische Sequenzen ausgewählt werden, die die konstitutive, gewebespezifische oder zelltypspezifische Expression von Antisense-RNA steuern. Der Antisense-Expressionsvektor kann in Form eines rekombinanten Plasmids, Phagemids oder attenuierten Virus vorliegen, in dem Antisense-Nukleinsäuren unter der Kontrolle eines hochwirksamen regulatorischen Bereichs produziert werden, dessen Aktivität durch den Zelltyp bestimmt wird, in den der Vektor eingebracht wird. Für eine Diskussion der Regulation der Genexpression mittels Antisense-Genen, siehe Weintraub, H. et al., Antisense-RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews - Trends in Genetics, Bd. 1(1) 1986.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Wirtszellen, in die ein erfindungsgemäßer rekombinanter Expressionsvektor eingebracht worden ist. Die Begriffe "Wirtszelle" und "rekombinante Wirtszelle" werden hier untereinander austauschbar verwendet. Es ist selbstverständlich, daß diese Begriffe nicht nur eine bestimmte Zielzelle, sondern auch die Nachkommen oder potentiellen Nachkommen dieser Zelle betreffen. Da in aufeinanderfolgenden Generationen aufgrund von Mutation oder Umwelteinflüssen bestimmte Modifikationen auftreten können, sind diese Nachkommen nicht unbedingt mit der Parentalzelle identisch, sind jedoch im Umfang des Begriffs, wie er hier verwendet wird, noch umfaßt.

30 Eine Wirtszelle kann eine prokaryotische oder eukaryotische Zelle sein. Bspw. kann ein MCT-Protein in Bakterienzellen, wie *C. glutamicum*, Insektenzellen, Hefe- oder Säugetierzellen (wie Ovarzellen des chinesischen Hamsters (CHO) oder COS-Zellen) exprimiert werden. Andere geeignete Wirtszellen sind dem Fachmann geläufig.

35 Mikroorganismen, die mit *Corynebacterium glutamicum* verwandt sind und sich geeignet als Wirtszellen für die erfindungsgemäßen Nukleinsäure- und Proteinmoleküle verwenden lassen, sind in Tabelle 3 aufgeführt.

40 Durch herkömmliche Transformations- oder Transfektionsverfahren läßt sich Vektor-DNA in prokaryotische oder eukaryotische Zellen einbringen. Die Begriffe "Transformation" und "Transfektion", "Konjugation" und "Transduktion" wie sie hier verwendet werden, sollen eine Vielzahl von im Stand der Technik bekannten Verfahren

45 zum Einbringen fremder Nukleinsäure (bspw. DNA) in eine Wirtszelle umfassen, einschließlich Calciumphosphat- oder Calciumchlorid-Copräzipitation, DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion,

Lipofektion oder Elektroporation. Geeignete Verfahren zur Transformation oder Transfektion von Wirtszellen lassen sich nachlesen in Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor 5 Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) und anderen Labor-Handbüchern.

Für die stabile Transfektion von Säugetierzellen ist bekannt, daß je nach verwendetem Expressionsvektor und verwendeter Transfektionstechnik nur ein kleiner Teil der Zellen die fremde DNA in ihr Genom integriert. Zur Identifizierung und Selektion dieser Integranden wird gewöhnlich ein Gen, das einen selektierbaren Marker (z.B. Resistenz gegen Antibiotika) codiert, zusammen mit dem Gen von Interesse in die Wirtszellen eingebracht. Bevorzugte selektierbare Marker umfassen solche, die die Resistenz gegen Medikamente, wie G418, Hygromycin und Methotrexat, verleihen. Eine Nukleinsäure, die einen selektierbaren Marker codiert, kann in eine Wirtszelle auf dem gleichen Vektor eingebracht werden, wie derjenige, der ein MCT-Protein codiert, oder kann auf einem gesonderten Vektor eingebracht werden. Zellen, die mit der eingebrachten Nukleinsäure stabil transfiziert worden sind, können durch Medikamentenselektion identifiziert werden (z.B. Zellen, die den selektierbaren Marker integriert haben, überleben, wohingegen die anderen Zellen sterben).

25 Zur Erzeugung eines homolog rekombinierten Mikroorganismus wird ein Vektor hergestellt, der zumindest einen Abschnitt eines MCT-Gens enthält, in den eine Deletion, Addition oder Substitution eingebracht worden ist, um das MCT-Gen zu verändern, bspw. funktionell zu disruptieren. Dieses MCT-Gen ist vorzugsweise ein *Corynebacterium glutamicum*-MCT-Gen, jedoch kann ein Homologon von einem verwandten Bakterium oder sogar von einer Säugetier-, Hefe- oder Insektenquelle verwendet werden. Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist der Vektor derart ausgestaltet, daß das endogene 30 MCT-Gen bei homologer Rekombination funktionell disruptiert ist (d.h. nicht länger ein funktionelles Protein codiert, ebenfalls bezeichnet als "Knockout"-Vektor). Der Vektor kann alternativ derart ausgestaltet sein, daß das endogene MCT-Gen bei homologer Rekombination mutiert oder anderweitig verändert ist, jedoch noch 35 das funktionelle Protein codiert (z.B. kann der stromaufwärts gelegene regulatorische Bereich derart verändert sein, daß dadurch die Expression des endogenen MCT-Proteins verändert wird.). Der veränderte Abschnitt des MCT-Gens ist im homologen Rekombinationsvektor an seinem 5'- und 3'-Ende von zusätzlicher Nukleinsäure 40 des MCT-Gens flankiert, die eine homologe Rekombination zwischen dem exogenen MCT-Gen, das von dem Vektor getragen wird, und einem endogenen MCT-Gen in einem Mikroorganismus, ermöglicht. Die zu-

sätzliche flankierende MCT-Nukleinsäure ist für eine erfolgreiche homologe Rekombination mit dem endogenen Gen hinreichend lang. Gewöhnlich enthält der Vektor mehrere Kilobasen flankierende DNA (sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende) (siehe z.B. Thomas, K.R. und 5 Capecchi, M.R. (1987) Cell 51: 503 für eine Beschreibung von homologen Rekombinationsvektoren). Der Vektor wird in einen Mikroorganismus (z.B. durch Elektroporation) eingebracht, und Zellen, in denen das eingebrachte MCT-Gen mit dem endogenen MCT-Gen homolog rekombiniert ist, werden unter Verwendung im Fachgebiet be- 10 kannter Verfahren selektiert.

Bei einer anderen Ausführungsform können rekombinante Mikroorganismen produziert werden, die ausgewählte Systeme enthalten, die eine regulierte Expression des eingebrachten Gens ermöglichen.

15 Der Einschluß eines MCT-Gens in einem Vektor unter der Kontrolle des Lac-Operons ermöglicht z.B. die Expression des MCT-Gens nur in Gegenwart von IPTG. Diese regulatorischen Systeme sind im Fachgebiet bekannt.

20 Eine erfindungsgemäße Wirtszelle, wie eine prokaryotische oder eukaryotische Wirtszelle in Kultur, kann zur Produktion (d.h. Expression) eines MCT-Proteins verwendet werden. Die Erfindung stellt zudem Verfahren zur Produktion von MCT-Proteinen unter Verwendung der erfindungsgemäßen Wirtszellen bereit. Bei einer 25 Ausführungsform umfaßt das Verfahren die Anzucht der erfindungsgemäßen Wirtszelle (in die ein rekombinanter Expressionsvektor, der ein MCT-Protein codiert, eingebracht worden ist, oder in deren Genom ein Gen eingebracht worden ist, das ein Wildtyp- oder verändertes MCT-Protein codiert) in einem geeigneten Medium, bis 30 das MCT-Protein produziert worden ist. Das Verfahren umfaßt in einer weiteren Ausführungsform das Isolieren der MCT-Proteine aus dem Medium oder der Wirtszelle.

C. Isolierte MCT-Proteine

35 Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft isolierte MCT-Proteine und biologisch aktive Abschnitte davon. Ein "isoliertes" oder "gereinigtes" Protein oder biologisch aktiver Abschnitt davon ist im Wesentlichen frei von zellulärem Material, wenn es durch DNA- 40 Rekombinationstechniken produziert wird, oder von chemischen Vorstufen oder andern Chemikalien, wenn es chemisch synthetisiert wird. Der Begriff "im Wesentlichen frei von zellulärem Material" umfaßt MCT-Proteinpräparationen, in denen das Protein von zellulären Komponenten der Zellen, in denen es natürlich oder rekombi- 45 nant produziert wird, getrennt ist. Bei einer Ausführungsform umfaßt der Ausdruck "im Wesentlichen frei von zellulärem Material" MCT-Proteinpräparationen mit weniger als etwa 30% (bezogen auf

das Trockengewicht) Nicht-MCT-Protein (ebenfalls als "kontaminierendes Protein" bezeichnet), stärker bevorzugt weniger als etwa 20%, noch stärker bevorzugt weniger als etwa 10% und am stärksten bevorzugt weniger als etwa 5% Nicht-MCT-Protein. Das MCT-Protein 5 oder ein biologisch aktiver Abschnitt davon enthält nach rekombinanter Produktion im Wesentlichen kein Kulturmedium, d.h. das Kulturmedium macht weniger als etwa 20%, stärker bevorzugt weniger als etwa 10% und am stärksten bevorzugt weniger als etwa 5% des Volumens der Proteinpräparation aus. Der Begriff "im Wesentlichen frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien" 10 umfaßt MCT-Proteinpräparationen, in denen das Protein von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien getrennt ist, die an der Synthese des Proteins beteiligt sind. Bei einer Ausführungsform umfaßt der Begriff "im Wesentlichen frei von chemischen Vorstufen 15 oder anderen Chemikalien" MCT-Proteinpräparationen mit weniger als etwa 30% (bezogen auf das Trockengewicht), stärker bevorzugt weniger als etwa 20%, noch stärker bevorzugt weniger als etwa 10% und am stärksten bevorzugt weniger als etwa 5% chemische Vorstufen oder Nicht-MCT-Chemikalien. In bevorzugten Ausführungsformen 20 weisen die isolierten Proteine oder biologisch aktiven Abschnitte davon keine kontaminierenden Proteine aus dem gleichen Organismus auf, aus dem das MCT-Protein abstammt. Diese Proteine werden gewöhnlich hergestellt durch rekombinante Expression bspw. eines *C. glutamicum*-MCT-Proteins in einem Mikroorganismus, wie *C. glutamicum*-cum. 25

Ein erfindungsgemäßes isoliertes MCT-Protein oder ein Abschnitt davon kann am Metabolismus von Verbindungen, die für den Aufbau der Zellmembran in *C. glutamicum* nötig sind, oder am Transport 30 der Moleküle über diese Membranen, beteiligt sein, oder hat eine oder mehrere der in Tabelle 1 angegebenen Aktivitäten. In bevorzugten Ausführungsformen umfaßt das Protein oder ein Abschnitt davon eine Aminosäuresequenz, die zu einer Aminosäuresequenz aus Anhang B hinreichend homolog ist, daß das Protein oder der Abschnitt 35 davon am Metabolismus von Verbindungen, die für den Aufbau der Zellmembran in *C. glutamicum* nötig sind, oder am Transport der Moleküle über diese Membranen, beteiligt sein kann. Der Abschnitt des Proteins ist vorzugsweise ein biologisch aktiver Abschnitt, wie hier beschrieben. Bei einer weiteren bevorzugten 40 Ausführungsform hat ein erfindungsgemäßes MCT-Protein eine der in Anhang B gezeigten Aminosäuresequenzen. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform hat das MCT-Protein eine Aminosäuresequenz, die von einer Nukleotidsequenz codiert wird, die, bspw. unter stringenten Bedingungen, an eine Nukleotidsequenz von Anhang A hybridisiert. In noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform hat das MCT-Protein eine Aminosäuresequenz, die von einer Nukleotidsequenz codiert wird und die mindestens etwa 50-60%, 45

vorzugsweise mindestens etwa 60-70%, stärker bevorzugt mindestens etwa 70-80%, 80-90%, 90-95% und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 96%, 97%, 98%, 99% oder noch homologer zu einer der Aminosäuresequenzen von Anhang B ist. Die erfindungsgemäßen bevorzugten 5 MCT-Proteine besitzen vorzugsweise ebenfalls mindestens eine der hier beschriebenen MCT-Aktivitäten. Ein erfindungsgemäßes bevorzugtes MCT-Protein umfaßt eine Aminosäuresequenz, die von einer Nukleotidsequenz codiert wird, die, bspw. unter stringenten Bedingungen, mit einer Nukleotidsequenz von Anhang A hybridisiert, 10 und die am Metabolismus von Verbindungen, die für den Aufbau der Zellmembran in *C. glutamicum* nötig sind, oder am Transport der Moleküle über diese Membranen, beteiligt sein kann, oder die eine oder mehrere der in Tabelle 1 angegebenen Aktivitäten aufweist.

15 Bei weiteren Ausführungsformen ist das MCT-Protein im Wesentlichen homolog zu einer Aminosäuresequenz von Anhang B und behält die funktionelle Aktivität des Proteins von einer der Sequenzen aus Anhang B, und unterscheidet sich dennoch in der Aminosäuresequenz aufgrund der natürlichen Variation oder Mutagenese, wie eingehend beschrieben in Unterabschnitt I oben. In einer weiteren Ausführungsform umfaßt das MCT-Protein eine Aminosäuresequenz, die mindestens etwa 50-60%, vorzugsweise mindestens etwa 60-70%, stärker bevorzugt mindestens etwa 70-80%, 80-90%, 90-95% und am 20 stärksten bevorzugt mindestens etwa 96%, 97%, 98%, 99% oder noch homologer zu einer vollständigen Aminosäuresequenz aus Anhang B ist und die zumindest eine der hier beschriebenen MCT-Aktivitäten aufweist. Bei einer anderen Ausführungsform betrifft die Erfindung ein *C. glutamicum*-Vollängenprotein, das im Wesentlichen homolog zu einer vollständigen Aminosäuresequenz aus Anhang B ist. 25 30

Biologisch aktive Abschnitte eines MCT-Proteins umfassen Peptide mit Aminosäuresequenzen, die von der Aminosäuresequenz eines MCT-Proteins hergeleitet sind, bspw. eine in Anhang B gezeigte Aminosäuresequenz oder die Aminosäuresequenz eines Proteins, das zu einem MCT-Protein homolog ist, die weniger Aminosäuren als das Vollängen-MCT-Protein oder das Vollängenprotein aufweisen, das zu einem MCT-Protein homolog ist, und zumindest eine Aktivität eines MCT-Proteins aufweisen. Gewöhnlich umfassen biologisch aktive Abschnitte (Peptide, bspw. Peptide, die bspw 5, 10, 15, 20, 30, 35, 40 36, 37, 38, 39, 40, 50, 100 oder mehr Aminosäuren lang sind) eine Domäne oder ein Motiv mit mindestens einer Aktivität eines MCT-Proteins. Überdies können andere biologisch aktive Abschnitte, in denen andere Bereiche des Proteins deletiert sind, durch rekombinante Techniken hergestellt werden und bezüglich einer oder mehrerer der hier beschriebenen Aktivitäten untersucht werden. Die biologisch aktiven Abschnitte eines MCT-Proteins umfassen vor-

zugsweise ein oder mehrere ausgewählte Domänen/Motive oder Abschnitte davon mit biologischer Aktivität.

MCT-Proteine werden vorzugsweise durch DNA-Rekombinationstechniken hergestellt. Bspw. wird ein Nukleinsäuremolekül, das das Protein codiert, in einen Expressionsvektor (wie vorstehend beschrieben) kloniert, der Expressionsvektor wird in eine Wirtszelle (wie vorstehend beschrieben) eingebracht, und das MCT-Protein wird in der Wirtszelle exprimiert. Das MCT-Protein kann dann durch ein geeignetes Reinigungsschema mittels Standard-Protein-Reinigungstechniken aus den Zellen isoliert werden. Alternativ zur rekombinanten Expression kann ein MCT-Protein, -Polypeptid, oder -Peptid mittels Standard-Peptidsynthesetechniken chemisch synthetisiert werden. Überdies kann natives MCT-Protein aus Zellen (bspw. Endothelzellen) z.B. mit einem Anti-MCT-Antikörper isoliert werden, der durch Standardtechniken produziert werden kann, wobei ein erfindungsgemäßes MCT-Protein oder ein Fragment davon verwendet wird.

Die Erfindung stellt auch chimäre MCT-Proteine oder MCT-Fusionsproteine bereit. Wie hier verwendet, umfaßt ein "chimäres MCT-Protein" oder "MCT-Fusionsprotein" ein MCT-Polypeptid, das funktionsfähig an ein Nicht-MCT-Polypeptid gebunden ist. Ein "MCT-Polypeptid" betrifft ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz, die MCT entspricht, wohingegen ein "Nicht-MCT-Polypeptid" ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz betrifft, die einem Protein entspricht, das im Wesentlichen nicht homolog zum MCT-Protein ist, z.B. ein Protein, das sich vom MCT-Protein unterscheidet und vom gleichen oder einem anderen Organismus herrührt.

Innerhalb des Fusionsproteins soll der Begriff "funktionsfähig verbunden" bedeuten, daß das MCT-Polypeptid und das Nicht-MCT-Polypeptid im Leseraster miteinander fusioniert sind. Das Nicht-MCT-Polypeptid kann an den N- oder C-Terminus des MCT-Polypeptids gebunden sein. Bei einer Ausführungsform ist das Fusionsprotein bspw. ein GST-MCT-Fusionsprotein, bei dem die MCT-Sequenzen an den C-Terminus der GST-Sequenz gebunden sind. Diese Fusionsproteine können die Reinigung des rekombinanten MCT-Proteins erleichtern. Bei einer weiteren Ausführungsform ist das Fusionsprotein ein MCT-Protein, das eine heterologe Signalsequenz an seinem N-Terminus aufweist. In bestimmten Wirtszellen (z.B. Säugetierwirtszellen) kann die Expression und/oder Sekretion eines MCT-Proteins durch Verwendung einer heterologen Signalsequenz gesteigert werden.

Ein erfindungsgemäßes chimäres MCT-Protein oder MCT-Fusionsprotein wird durch Standard-DNA-Rekombinationstechniken produziert. DNA-Fragmente, die unterschiedliche Polypeptidsequenzen codieren,

werden gemäß herkömmlicher Techniken im Leseraster aneinander
ligiert, bspw. durch Einsatz glatter oder überhängender Enden zur
Ligation, Restriktionsenzymspaltung zur Bereitstellung geeigneter
Enden, Auffüllen kohäsiver Enden, falls erforderlich, Behandlung
5 mit alkalischer Phosphatase, um ungewollte Verknüpfungen zu ver-
meiden, und enzymatische Ligierung. Bei einer weiteren Ausfüh-
rungsform kann das Fusionsgen durch herkömmliche Techniken, ein-
schließlich DNA-Syntheseautomaten, synthetisiert werden. Alterna-
tiv kann eine PCR-Amplifizierung von Genfragmenten mittels Anker-
10 primern durchgeführt werden, die komplementäre Überhänge zwischen
aufeinanderfolgenden Genfragmenten erzeugen. Diese können an-
schließend miteinander hybridisiert und reamplifiziert werden, so
daß eine chimäre Gensequenz erzeugt wird (s. bspw. Current Proto-
cols in Molecular Biology, Hrsg. Ausubel et al., John Wiley &
15 Sons: 1992). Überdies sind viele Expressionsvektoren kommerziell
erhältlich, die schon eine Fusionseinheit codieren (bspw. ein
GST-Polypeptid). Eine MCT-codierende Nukleinsäure kann in einen
solchen Expressionsvektor kloniert werden, so daß die Fusionsein-
heit mit dem MCT-Protein im Leseraster verbunden ist.

20 Homologa des MCT-Proteins können durch Mutagenese erzeugt werden,
z.B. durch bestimmte Punktmutation oder Verkürzung des MCT-Pro-
teins. Der Begriff "Homologon", wie er hier verwendet wird, be-
trifft eine variante Form des MCT-Proteins, die als Agonist oder
25 Antagonist der MCT-Protein-Aktivität wirkt. Ein Agonist des MCT-
Proteins kann im Wesentlichen die gleiche oder einen Teil der
biologischen Aktivitäten des MCT-Proteins beibehalten. Ein Anta-
gonist des MCT-Proteins kann eine oder mehrere Aktivitäten der
natürlich vorkommenden Form des MCT-Proteins bspw. durch kompeti-
30 tive Bindung an ein stromabwärts oder -aufwärts gelegenes Element
der Stoffwechselkaskade für Zellmembrankomponenten, die das MCT-
Protein umfaßt, oder durch Binden an eine MCT-Protein, das den
Transport von Verbindungen über diese Membranen vermittelt, hem-
men, wodurch verhindert wird, daß eine Translokation stattfindet.

35 Bei einer alternativen Ausführungsform können Homologa des MCT-
Proteins durch Screening kombinatorischer Mutanten-Banken, bspw.
Verkürzungsmutanten, des MCT-Proteins auf MCT-Protein-Agonisten-
oder -Antagonisten-Aktivität identifiziert werden. Bei einer Aus-
40 führungsform wird eine variegierte Bank von MCT-Varianten durch
kombinatorische Mutagenese auf dem Nukleinsäure-Niveau erzeugt
und von der variegierten Genbank codiert. Eine variegierte Bank
von MCT-Varianten kann bspw durch enzymatisches Ligieren eines
Gemisches synthetischer Oligonukleotide in die Gensequenzen her-
45 gestellt werden, so daß sich ein degenerierter Satz potentieller
MCT-Sequenzen als individuelle Polypeptide oder alternativ als
Satz größerer Fusionsproteine (z.B. Für Phage-Display), die die-

sen Satz von MCT-Sequenzen enthalten, exprimieren lässt. Es gibt eine Vielzahl von Verfahren, die zur Herstellung von Banken potentieller MCT-Homologa aus einer degenerierten Oligonukleotidsequenz verwendet werden können. Die chemische Synthese einer degenerierten Gensequenz kann in einem DNA-Syntheseautomaten durchgeführt werden, und das synthetische Gen kann dann in den geeigneten Expressionsvektor ligiert werden. Die Verwendung eines degenerierten Gensatzes ermöglicht die Bereitstellung sämtlicher Sequenzen, die den gewünschten Satz an potentiellen MCT-Sequenzen codieren, in einem Gemisch. Verfahren zur Synthese degenerierter Oligonukleotide sind im Fachgebiet bekannt (s. bspw. Narang, S.A. (1983) Tetrahedron 39: 3; Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53: 323; Itakura et al., (1984) Science 198: 1056; Ike et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11: 477).

15

Zusätzlich können Banken von Fragmenten der MCT-Protein-Codierung verwendet werden, um eine variegierte Population von MCT-Fragmenten zum Screening und für die anschließende Selektion von Homologa eines MCT-Proteins zu erzeugen. Bei einer Ausführungsform kann eine Bank codierender Sequenzfragmente erzeugt werden durch Behandeln eines doppelsträngigen PCR-Fragmentes einer codierenden MCT-Sequenz mit einer Nuklease unter Bedingungen, unter denen ein Nicking nur etwa einmal pro Molekül erfolgt, Denaturieren der doppelsträngigen DNA, Renaturieren der DNA unter Bildung doppelsträngiger DNA, die Sense-/Antisense-Paare von verschiedenen genickten Produkten umfassen kann, Entfernen einzelsträngiger Abschnitte aus neu gebildeten Duplices durch Behandlung mit S1-Nuklease, und Ligieren der resultierenden Fragmentbank in einen Expressionsvektor. Durch dieses Verfahren kann eine Expressionsbank hergeleitet werden, die N-terminale, C-terminale und interne Fragmente verschiedenen Größen des MCT-Proteins codiert.

Im Fachgebiet sind mehrere Techniken zum Screening von Genprodukten kombinatorischer Banken, die durch Punktmutationen oder Verkürzung hergestellt worden sind, und zum Screening von cDNA-Banken auf Genprodukte mit einer ausgewählten Eigenschaft, bekannt. Diese Techniken lassen sich an das schnelle Screening der Genbanken anpassen, die durch kombinatorische Mutagenese von MCT-Homologa erzeugt worden sind. Die am häufigsten verwendeten Techniken zum Screening großer Genbanken, die einer Analyse mit hohem Durchsatz unterliegen, umfassen das Klonieren der Genbank in replizierbare Expressionsvektoren, Transformieren der geeigneten Zellen mit der resultierenden Vektorenbank und Exprimieren der kombinatorischen Gene unter Bedingungen, unter denen der Nachweis der gewünschten Aktivität die Isolation des Vektors, der das Gen codiert, dessen Produkt nachgewiesen wurde, erleichtert.

Recursive Ensemble Mutagenese (REM), eine neue Technik, die die Häufigkeit funktioneller Mutanten in den Banken vergrößert, kann in Kombination mit den Screeningtests verwendet werden, um MCT-Homologa zu identifizieren (Arkin und Yourvan (1992) PNAS 89: 7811-7815; Delgrave et al. (1993) Protein Engineering 6(3): 327-331).

Bei einer weiteren Ausführungsform können zellbezogene Tests zur Analyse einer variegierten MCT-Bank unter Verwendung von im Fachgebiet bekannten Verfahren verwendet werden.

D. Erfindungsgemäße Verwendungen und Verfahren

Die hier beschriebenen Nukleinsäuremoleküle, Proteine, Proteinhomologa, Fusionsproteine, Primer, Vektoren und Wirtszellen können in einem oder mehreren nachstehenden Verfahren verwendet werden: Identifikation von *C. glutamicum* und verwandten Organismen, Kartierung von Genomen von Organismen, die mit *C. glutamicum* verwandt sind, Identifikation und Lokalisation von *C. glutamicum*-Sequenzen von Interesse, Evolutionsstudien, Bestimmung von MCT-Proteinbereichen, die für die Funktion notwendig sind, Modulation der Aktivität eines MCT-Proteins; Modulation der Aktivität eines MCT-Wegs; und Modulation der zellulären Produktion einer gewünschten Verbindung, wie einer Feinchemikalie. Die erfindungsgemäßen MCT-Nukleinsäuremoleküle haben eine Vielzahl von Verwendungen. Sie können zunächst zur Identifikation eines Organismus als *Corynebacterium glutamicum* oder naher Verwandten davon verwendet werden. Sie können zudem zur Identifikation von *C. glutamicum* oder eines Verwandten davon in einer Mischpopulation von Mikroorganismen verwendet werden. Die Erfindung stellt die Nukleinsäuresequenzen einer Reihe von *C. glutamicum*-Genen bereit. Durch Sondieren der extrahierten genomischen DNA einer Kultur einer einheitlichen oder gemischten Population von Mikroorganismen unter stringenten Bedingungen mit einer Sonde, die einen Bereich eines *C. glutamicum*-Gens umfaßt, das für diesen Organismus einzigartig ist, kann man bestimmen, ob dieser Organismus zugegen ist. *Corynebacterium glutamicum* selbst ist zwar nicht pathogen, jedoch ist es mit pathogenen Arten, wie *Corynebacterium diphtheriae*, verwandt. Der Nachweis eines solchen Organismus ist von signifikanter klinischer Bedeutung.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäure- und Proteinmoleküle können als Marker für spezifische Bereiche des Genoms dienen. Dies ist nicht nur beim Kartieren des Genoms, sondern auch für funktionelle Studien von *C. glutamicum*-Proteinen nützlich. Zur Identifikation des Genombereichs, an den ein bestimmtes *C. glutamicum*-DNA-bindendes Protein bindet, kann das *C. glutamicum*-Genom bspw.

gespalten werden, und die Fragmente mit dem DNA-bindenden Protein inkubiert werden. Diejenigen, die das Protein binden, können zusätzlich mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen, vorzugsweise mit leicht nachweisbaren Markierungen, sondiert werden; 5 die Bindung eines solchen Nukleinsäuremoleküls an das Genomfragment ermöglicht die Lokalisation des Fragmentes auf der genomischen Karte von *C. glutamicum*, und wenn dies mehrmals mit unterschiedlichen Enzymen durchgeführt wird, erleichtert es eine rasche Bestimmung der Nukleinsäuresequenz, an die das Protein 10 bindet. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle können zudem hinreichend homolog zu den Sequenzen verwandter Arten sein, so daß diese Nukleinsäuremoleküle als Marker für die Konstruktion einer genomischen Karte in verwandten Bakterien, wie *Brevibacterium lactofermentum*, dienen können.

15

Die erfindungsgemäßen MCT-Nukleinsäuremoleküle eignen sich ebenfalls für Evolutions- und Proteinstrukturuntersuchungen. Die Stoffwechsel- und Transportprozesse, an denen die erfindungsgemäßen Moleküle beteiligt sind, werden bei einer vielen prokaryotischen und eukaryotischen Zellen verwendet; durch Vergleich der 20 Sequenzen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle mit solchen, die ähnliche Enzyme aus anderen Organismen codieren, kann der Evolutions-Verwandschaftsgrad der Organismen bestimmt werden. Entsprechend ermöglicht ein solcher Vergleich die Bestimmung, 25 welche Sequenzbereiche konserviert sind und welche nicht, was bei der Bestimmung solcher Bereiche des Proteins hilfreich sein kann, die für die Enzymfunktion essentiell sind. Dieser Typ der Bestimmung ist für Proteintechnologie-Untersuchungen wertvoll und kann einen Hinweis darauf geben, welches Protein Mutagenese 30 tolerieren kann, ohne die Funktion zu verlieren.

Die Manipulation der erfindungsgemäßen MCT-Nukleinsäuremoleküle kann die Produktion von MCT-Proteinen mit funktionellen Unterschieden zu den Wildtyp-MCT-Proteinen bewirken. Diese Proteine 35 können hinsichtlich ihrer Effizienz oder Aktivität verbessert werden, können in größerer Anzahl als gewöhnlich in der Zelle zugegen sein, oder können hinsichtlich ihrer Effizienz oder Aktivität geschwächt sein.

40 Es gibt viele Mechanismen, durch die die Veränderung einer erfindungsgemäßen MCT-Moleküls die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer oder mehrerer Feinchemikalien von einem *C. glutamicum*-Stamm, der ein solches verändertes Protein enthält, direkt beeinflußt. Die Gewinnung der Feinchemikalienverbindungen aus großangelegten *C. glutamicum*-Kulturen ist signifikant 45 verbessert, wenn *C. glutamicum* die gewünschten Verbindungen sezerniert, da diese Verbindungen leicht aus dem Kulturmedium

gereinigt werden können (im Gegensatz zur Extraktion aus der Masse von *C. glutamicum*-Zellen). Durch Vergrößern der Anzahl oder Aktivität von Transportermolekülen, die die Feinchemikalien aus der Zelle exportieren, kann es möglich sein, die Menge der produzierten Feinchemikalie, die im extrazellulären Medium zugegen ist, zu steigern, wodurch die Ernte und Reinigung erleichtert wird. Zur effizienten Überproduktion von einer oder mehreren Feinchemikalien sind dagegen erhöhte Mengen von Cofaktoren, Vorstufenmolekülen und Zwischenverbindungen für die geeigneten Biosynthesewege erforderlich. Durch Vergrößern der Anzahl und/oder der Aktivität von Transporterproteinen, die am Import von Nährstoffen, wie Kohlenstoffquellen (d.h. Zuckern), Stickstoffquellen (d.h. Aminosäuren, Ammoniumsalzen), Phosphaten und Schwefel beteiligt sind, kann man die Produktion einer Feinchemikalie aufgrund der Entfernung von jeglichen Einschränkungen des Nährstoffangebots bei dem Biosyntheseprozess verbessern. Zudem sind Fettsäuren und Lipide selbst wünschenswerte Feinchemikalien; durch Optimieren der Aktivität oder durch Vergrößern der Anzahl von einem oder mehreren erfindungsgemäßen MCT-Proteinen, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Beeinflussen der Aktivität von einem oder mehreren MCT-Proteinen, die am Abbau dieser Verbindungen beteiligt sind, kann man die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Fett- und Lipidmoleküle von *C. glutamicum* steigern.

Die genetische Manipulation von einem oder mehreren erfindungsgemäßen MCT-Genen kann ebenfalls MCT-Proteine mit veränderten Aktivitäten hervorbringen, die die Produktion von einer oder mehreren gewünschten Feinchemikalien aus *C. glutamicum* indirekt beeinflussen. Die normalen biochemischen Stoffwechselprozesse bewirken bspw. die Produktion einer Vielzahl von Abfallprodukten (z.B. Wasserstoffperoxid und andere reaktive Sauerstoffspezies) die mit den gleichen Stoffwechselprozessen aktiv wechselwirken können (bspw. nitriert Peroxynitrit bekanntlich Tyrosin-Seitenketten, wodurch einige Enzyme mit Tyrosin im aktiven Zentrum inaktiviert werden (Groves, J.T. (1999) Curr. Opin. Chem. Biol. 3(2): 226-235). Diese Abfallprodukte werden zwar üblicherweise ausgeschieden, die zur fermentativen Großproduktion verwendeten *C. glutamicum*-Stämme werden zur Überproduktion von einer oder mehreren Feinchemikalien jedoch optimiert und können so mehr Abfallprodukte produzieren als für einen *C. glutamicum*-Wildtyp üblich ist. Durch Optimieren der Aktivität von einem oder mehreren erfindungsgemäßen MCT-Proteinen, die am Export von Abfallmolekülen beteiligt sind, kann man die Lebensfähigkeit der Zelle verbessern und eine effiziente metabolische Aktivität beibehalten. Das Vorliegen hoher intrazellulärer Mengen der gewünschten Feinchemikalie kann für die Zelle toxisch sein, so kann man durch Steigern

der Fähigkeit der Zelle zur Sekretion dieser Verbindungen die Lebensfähigkeit der Zelle verbessern.

Die erfindungsgemäßen MCT-Proteine können manipuliert werden, so daß die relativen Mengen verschiedener Lipid- und Fettsäuremoleküle verändert werden. Dies kann eine erhebliche Auswirkung auf die Lipidzusammensetzung der Zellmembran haben. Da jeder Lipidtyp unterschiedliche physikalische Eigenschaften hat, kann eine Veränderung der Lipidzusammensetzung einer Membran die Membranfluidität signifikant verändern. Änderungen der Membranfluidität können den Transport von Molekülen über die Membran beeinflussen, was wie vorstehend erläutert den Export von Abfallprodukten oder der produzierten Feinchemikalie oder den Import von notwendigen Nährstoffen modifizieren kann. Diese Membranfluiditätsänderungen können ebenfalls die Zellintegrität erheblich beeinflussen; Zellen mit relativ schwächeren Membranen sind in einer Groß-Fermenterumgebung anfälliger gegenüber mechanischem Stress, was die Zellen beschädigen oder abtöten kann. Durch Manipulieren von MCT-Proteinen, die an der Produktion von Fettsäuren und Lipiden für den Membranaufbau beteiligt sind, so daß die Membranzusammensetzung der resultierenden Membran gegenüber den in den Kulturen, die zur Produktion von Feinchemikalien verwendet werden, herrschenden Umweltbedingungen empfänglicher sind, sollten ein größerer Anteil an *C. glutamicum*-Zellen überleben und sich vermehren. Größere Mengen an *C. glutamicum*-Zellen in einer Kultur sollten größere Ausbeuten, Produktion oder Effizienz der Produktion der Feinchemikalie aus der Kultur ergeben.

Die vorstehend genannten Mutagenesestrategien für MCT-Proteine, die erhöhte Ausbeuten einer Feinchemikalie aus *C. glutamicum* bewirken sollen, sollen nicht einschränkend sein; Variationen dieser Strategien sind dem Fachmann leicht ersichtlich. Durch diese Mechanismen und mit Hilfe der hier offenbarten Mechanismen können die erfindungsgemäßen Nukleinsäure- und Proteinmoleküle verwendet werden, um *C. glutamicum* oder verwandte Bakterienstämme, die mutierte MCT-Nukleinsäure- und Proteinmoleküle exprimieren, zu erzeugen, so daß die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Verbindung verbessert wird. Die gewünschte Verbindung kann ein natürliches Produkt von *C. glutamicum* sein, welches die Endprodukte der Biosynthesewege und Zwischenprodukte natürlich vorkommender metabolischer Wege sowie Moleküle umfaßt, die im Metabolismus von *C. glutamicum* nicht natürlich vorkommen, die jedoch von einem erfindungsgemäßen *C. glutamicum*-Stamm produziert werden.

Diese Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele weiter veranschaulicht, die nicht als einschränkend aufgefaßt werden sollen. Die Inhalte sämtlicher, in dieser Patentanmeldung zitiert-
5 licher Literaturstellen, Patentanmeldungen, Patente und veröffent-lichter Patentanmeldungen sind hiermit durch Bezugnahme aufge-
nommen.

Beispiele

10 Beispiel 1: Präparation der gesamten genomischen DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

Eine Kultur von *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032) wurde über Nacht bei 30°C unter starkem Schütteln in BHI-Medium (Difco) 15 gezüchtet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, der Überstand wurde verworfen, und die Zellen wurden in 5ml Puffer I (5% des Ursprungsvolumens der Kultur - sämtliche angegebenen Volumina sind für 100 ml Kulturvolumen berechnet) resuspendiert. Die Zusammensetzung von Puffer I: 140,34 g/l Saccharose, 2,46 g/l 20 $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 10 ml/l KH_2PO_4 -Lösung (100g/l, mit KOH eingestellt auf pH-Wert 6,7), 50 ml/l M12-Konzentrat (10 g/l $(NH_4)_2SO_4$, 1 g/l NaCl, 2 g/l $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,2 g/l $CaCl_2$, 0,5 g/l Hefe-Extrakt (Difco), 10 ml/l Spurenelemente-Mischung (200 mg/l $FeSO_4 \cdot H_2O$, 10 mg/l $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$, 3 mg/l $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$, 30 mg/l H_3BO_3 , 20 mg/l 25 $CoCl_2 \cdot 6 H_2O$, 1 mg/l $NiCl_2 \cdot 6 H_2O$, 3 mg/l $Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$, 500 mg/l Komplexbildner (EDTA oder Citronensäure), 100 ml/l Vitamingemisch (0,2 ml/l Biotin, 0,2 mg/l Folsäure, 20 mg/l p-Aminobenzoësäure, 20 mg/l Riboflavin, 40 mg/l Ca-Panthothenat, 140 mg/l Nikotinsäure, 40 mg/l Pyridoxolhydrochlorid, 200 mg/l Myoinositol). 30 Lysozym wurde in einer Endkonzentration von 2,5 mg/ml zur Suspension gegeben. Nach etwa 4 Std. Inkubation bei 37°C wurde die Zellwand abgebaut, und die erhaltenen Protoplasten wurden durch Zentrifugation geerntet. Das Pellet wurde einmal mit 5 ml Puffer I und einmal mit 5 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH-Wert 8) gewaschen. Das Pellet wurde in 4 ml TE-Puffer resuspendiert, und 0,5 ml SDS-Lösung (10%) und 0,5 ml NaCl-Lösung (5 M) wurden zugegeben. Nach Zugabe von Proteinase K in einer Endkonzentration von 200 $\mu g/ml$ wurde die Suspension etwa 18 Std. bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde durch Extraktion mit Phenol, Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol und Chloroform-Isoamylalkohol mittels Standard-Verfahren gereinigt. Dann wurde die DNA durch Zugabe von 1/50 Volumen 3 M Natriumacetat und 2 Volumina Ethanol, anschließender Inkubation für 30 min bei -20°C und 30 min Zentrifugation bei 12000 U/min in einer Hochgeschwindigkeitszentrifuge mit einem 40 SS34-Rotor (Sorvall) gefällt. Die DNA wurde in 1 ml TE-Puffer 45 gelöst, der 20 $\mu g/ml$ RNase A enthielt, und für mindestens 3 Std. bei 4°C gegen 1000 ml TE-Puffer dialysiert. Während dieser Zeit

wurde der Puffer 3mal ausgetauscht. Zu Aliquots von 0,4 ml der dialysierten DNA-Lösung wurden 0,4 ml 2 M LiCl und 0,8 ml Ethanol zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei -20°C wurde die DNA durch Zentrifugation gesammelt (13000 U/min, Biofuge Fresco, Heraeus, 5 Hanau, Deutschland). Das DNA-Pellet wurde in TE-Puffer gelöst. Durch dieses Verfahren hergestellte DNA konnte für alle Zwecke verwendet werden, einschließlich Southern-Blotting oder zur Konstruktion genomischer Banken.

10 Beispiel 2: Konstruktion genomischer *Corynebacterium glutamicum* (ATCC13032)-Banken in *Escherichia coli*

Ausgehend von DNA, hergestellt wie in Beispiel 1 beschrieben, wurden gemäß bekannter und gut eingeführter Verfahren (siehe 15 bspw. Sambrook, J. et al. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press oder Ausubel, F.M. et al. (1994) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons) Cosmid- und Plasmid-Banken hergestellt.

20 Es ließ sich jedes Plasmid oder Cosmid einsetzen. Besondere Verwendung fanden die Plasmide pBR322 (Sutcliffe, J.G. (1979) Proc. Natl Acad. Sci. USA, 75: 3737-3741); pACYC177 (Change & Cohen (1978) J. Bacteriol. 134: 1141-1156); Plasmide der PBS-Reihe (pBSSK+, pBSSK- und andere; Stratagene, LaJolla, USA) oder 25 Cosmide, wie SuperCos1 (Stratagene, LaJolla, USA) oder Lorist6 (Gibson, T.J. Rosenthal, A., und Waterson, R.H. (1987) Gene 53: 283-286.

Beispiel 3: DNA-Sequenzierung und Computer-Funktionsanalyse

30 Genomische Banken, wie in Beispiel 2 beschrieben, wurden zur DNA-Sequenzierung gemäß Standard-Verfahren, insbesondere dem Kettenabbruchverfahren mit ABI377-Sequenziermaschinen (s. z.B. Fleischman, R.D. et al. (1995) "Whole-genome Random Sequencing and 35 Assembly of *Haemophilus Influenzae* Rd.", Science 269; 496-512) verwendet. Die Sequenzierprimer mit den folgenden Nukleotidsequenzen wurden verwendet: 5'-GGAAACAGTATGACCATG-3' oder 5'-GTAAAACGACGCCAGT-3'.

40 Beispiel 4: In-vivo-Mutagenese

In vivo-Mutagenese von *Corynebacterium glutamicum* kann durchgeführt werden, indem eine Plasmid- (oder andere Vektor-) DNA durch *E. coli* oder andere Mikroorganismen (z.B. *Bacillus* spp. 45 oder Hefen, wie *Saccharomyces cerevisiae*) geleitet wird, die die Integrität ihrer genetischen Information nicht aufrechterhalten können. Übliche Mutatorstämme weisen Mutationen in den Genen für

das DNA-Reparatursystem auf (z.B., mutHLS, mutD, mutT, usw., zum Vergleich siehe Rupp, W.D. (1996) DNA repair mechanisms in *Escherichia coli* and *Salmonella*, S. 2277-2294, ASM: Washington). Diese Stämme sind dem Fachmann bekannt. Die Verwendung dieser Stämme ist bspw. in Greener, A. und Callahan, M. (1994) Strategies 7; 32-34 veranschaulicht.

Beispiel 5: DNA-Transfer zwischen *Escherichia coli* und *Corynebacterium glutamicum*

10

Mehrere *Corynebacterium*- und *Brevibacterium*-Arten enthalten endogene Plasmide (wie bspw. pHM1519 oder pBL1) die autonom replizieren (für einen Überblick siehe bspw. Martin, J.F. et al. (1987) Biotechnology 5: 137-146). Shuttle-Vektoren für *Escherichia coli* und *Corynebacterium glutamicum* lassen sich leicht mittels Standard-Vektoren für *E. coli* konstruieren (Sambrook, J. et al., (1989), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press oder Ausubel, F.M. et al. (1994) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons), denen ein Replikationsursprung für und ein geeigneter Marker aus *Corynebacterium glutamicum* beigegeben wird. Solche Replikationsursprünge werden vorzugsweise von endogenen Plasmiden entnommen, die aus *Corynebacterium*- und *Brevibacterium*-Arten isoliert worden sind. Besondere Verwendung als Transformationsmarker für diese Arten sind Gene für Kanamycin-Resistenz (wie solche, die vom Tn5- oder Tn-903-Transposon stammen) oder für Chloramphenicol (Winnacker, E.L. (1987) "From Genes to Clones - Introduction to Gene Technology, VCH, Weinheim). Es gibt zahlreiche Beispiele in der Literatur zur Herstellung einer großen Vielzahl von Shuttle-Vektoren, die in *E. coli* und *C. glutamicum* repliziert werden, und die für verschiedene Zwecke verwendet werden können, einschließlich Gen-Überexpression (siehe bspw. Yoshihama, M. et al. (1985) J. Bacteriol. 162: 591-597, Martin, J.F. et al., (1987) Biotechnology, 5: 137-146 und Eikmanns, B.J. et al. (1992) Gene 35 102: 93-98).

Mittels Standard-Verfahren ist es möglich, ein Gen von Interesse in einen der vorstehend beschriebenen Shuttle-Vektoren zu klonieren und solche Hybrid-Vektoren in *Corynebacterium glutamicum*-Stämme einzubringen. Die Transformation von *C. glutamicum* lässt sich durch Protoplastentransformation (Kastsumata, R. et al., (1984) J. Bacteriol. 159, 306-311), Elektroporation (Liebl, E. et al., (1989) FEMS Microbiol. Letters, 53: 399-303) und in Fällen, bei denen spezielle Vektoren verwendet werden, auch durch Konjugation erzielen (wie z.B. beschrieben in Schäfer, A., et (1990) J. Bacteriol. 172: 1663-1666). Es ist ebenfalls möglich, die Shuttle-Vektoren für *C. glutamicum* auf *E. coli* zu übertragen,

indem Plasmid-DNA aus *C. glutamicum* (mittels im Fachgebiet bekannter Standard-Verfahren) präpariert wird und in *E. coli* transformiert wird. Dieser Transformationsschritt kann mit Standard-Verfahren erfolgen, jedoch wird vorteilhafterweise ein

5 *Mcr*-defizienter *E. coli*-Stamm verwendet, wie NM522 (Gough & Murray (1983) *J. Mol. Biol.* 166: 1-19).

Beispiel 6: Bestimmung der Expression des mutierten Proteins

10 Die Beobachtungen der Aktivität eines mutierten Proteins in einer transformierten Wirtszelle beruhen auf der Tatsache, daß das mutierte Protein auf ähnliche Weise und in ähnlicher Menge exprimiert wird wie das Wildtyp-Protein. Ein geeignetes Verfahren zur Bestimmung der Transkriptionsmenge des mutierten Gens (ein Anzeichen für die mRNA-Menge, die für die Translation des Genprodukts verfügbar ist) ist die Durchführung eines Northern-Blots (s. bspw. Ausubel et al., (1988) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley: New York), wobei ein Primer, der so ausgestaltet ist, daß er an das Gen von Interesse bindet, mit einer nachweisbaren (gewöhnlich radioaktiven oder chemilumineszierenden) Markierung versehen wird, so daß - wenn die Gesamt-RNA einer Kultur des Organismus extrahiert, auf einem Gel aufgetrennt, auf eine stabile Matrix übertragen und mit dieser Sonde inkubiert wird - die Bindung und die Quantität der Bindung der Sonde das Vorliegen

15 und auch die Menge von mRNA für dieses Gen anzeigt. Diese Information ist ein Nachweis für das Ausmaß der Transkription des mutierten Gens. Gesamt-Zell-RNA läßt sich durch verschiedene Verfahren aus *Corynebacterium glutamicum* isolieren, die im Fachgebiet bekannt sind, wie beschrieben in Bormann, E.R. et al.,

20 (1992) *Mol. Microbiol.* 6: 317-326.

Zur Bestimmung des Vorliegens oder der relativen Menge von Protein, das aus dieser mRNA translatiert wird, können Standard-Techniken, wie Western-Blot, eingesetzt werden (s. bspw. Ausubel et al. (1988) "Current Protocols in Molecular Biology", Wiley, New York). Bei diesem Verfahren werden Gesamt-Zellproteine extrahiert, durch Gelelektrophorese getrennt, auf eine Matrix, wie Nitrocellulose, übertragen und mit einer Sonde, wie einem Antikörper, inkubiert, die an das gewünschte Protein spezifisch bindet. Diese Sonde ist gewöhnlich mit einer chemilumineszierenden oder kolorimetrischen Markierung versehen, die sich leicht nachweisen läßt. Das Vorliegen und die beobachtete Menge an Markierung zeigt das Vorliegen und die Menge des gesuchten Mutantenproteins in der Zelle an.

Beispiel 7: Wachstum von genetisch verändertem *Corynebacterium glutamicum* - Medien und Anzuchtbedingungen

Genetisch veränderte *Corynebakterien* werden in synthetischen oder natürlichen Wachstumsmedien gezüchtet. Eine Anzahl unterschiedlicher Wachstumsmedien für *Corynebakterien* sind bekannt und leicht erhältlich (Lieb et al. (1989) Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 205-210; von der Osten et al. (1998) Biotechnology Letters 11: 11-16; Patent DE 4 120 867; Liebl (1992) "The Genus *Corynebacterium*", in: The Prokaryotes, Bd. II, Balows, A., et al., Hrsg. Springer-Verlag). Diese Medien bestehen aus einer oder mehreren Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, anorganischen Salzen, Vitaminen und Spurenelementen. Bevorzugte Kohlenstoffquellen sind Zucker, wie Mono-, Di- oder Polysaccharide. Sehr gute Kohlenstoffquellen sind bspw. Glucose, Fructose, Mannose, Galactose, Ribose, Sorbose, Ribulose, Lactose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Stärke oder Cellulose. Man kann Zucker auch über komplexe Verbindungen, wie Melassen, oder andere Nebenprodukte aus der Zucker-Raffinierung zu den Medien geben. Es kann auch vorteilhaft sein, Gemische verschiedener Kohlenstoffquellen zuzugeben. Andere mögliche Kohlenstoffquellen sind Alkohole und organische Säuren, wie Methanol, Ethanol, Essigsäure oder Milchsäure. Stickstoffquellen sind gewöhnlich organische oder anorganische Stickstoffverbindungen oder Materialien, die diese Verbindungen enthalten. Beispielhafte Stickstoffquellen umfassen Ammoniak-Gas oder Ammoniumsalze, wie NH_4Cl oder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4OH , Nitrate, Harnstoff, Aminosäuren oder komplexe Stickstoffquellen, wie Maisquellwasser, Sojamehl, Sojaprotein, Hefeextrakte, Fleischextrakte und andere.

Anorganische Salzverbindungen, die in den Medien enthalten sein können, umfassen die Chlorid-, Phosphor-, oder Sulfatsalze von Calcium, Magnesium, Natrium, Kobalt, Molybdän, Kalium, Mangan, Zink, Kupfer und Eisen. Chelatbildner können zum Medium gegeben werden, um die Metallionen in Lösung zu halten. Besonders geeignete Chelatbildner umfassen Dihydroxyphenole, wie Catechol oder Protocatechuat oder organische Säuren, wie Citronensäure. Die Medien enthalten üblicherweise auch andere Wachstumsfaktoren, wie Vitamine oder Wachstumsförderer, zu denen bspw. Biotin, Riboflavin, Thiamin, Folsäure, Nikotinsäure, Panthothenat und Pyridoxin gehören. Wachstumsfaktoren und Salze stammen häufig von komplexen Medienkomponenten, wie Hefeextrakt, Melassen, Maisquellwasser und dergleichen. Die genaue Zusammensetzung der Medienverbindungen hängt stark vom jeweiligen Experiment ab und wird für jeden Fall individuell entschieden. Information über die Medienoptimierung ist erhältlich aus dem Lehrbuch "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (Hrsg. P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press

(1997) S. 53-73, ISBN 0 19 963577 3). Wachstumsmedien lassen sich auch von kommerziellen Anbietern beziehen, wie Standard 1 (Merck) oder BHI (Brain heart infusion, DIFCO) und dergleichen.

5 Sämtliche Medienkomponenten sind sterilisiert, entweder durch Hitze (20 min bei 1,5 bar und 121°C) oder durch Sterilfiltration. Die Komponenten können entweder zusammen oder nötigenfalls getrennt sterilisiert werden. Sämtliche Medienkomponenten können zu Beginn der Anzucht zugegen sein oder wahlfrei kontinuierlich oder 10. chargenweise hinzugegeben werden.

Die Anzuchtbedingungen werden für jedes Experiment gesondert definiert. Die Temperatur sollte zwischen 15°C und 45°C liegen und kann während des Experimentes konstant gehalten oder verändert 15 werden. Der pH-Wert des Mediums sollte im Bereich von 5 bis 8,5, vorzugsweise um 7,0 liegen, und kann durch Zugabe von Puffern zu den Medien aufrechterhalten werden. Ein beispielhafter Puffer für diesen Zweck ist ein Kaliumphosphatpuffer. Synthetische Puffer, wie MOPS, HEPES, ACES usw., können alternativ oder gleichzeitig 20 verwendet werden. Der Anzucht-pH-Wert lässt sich während der Anzucht auch durch Zugabe von NaOH oder NH₄OH konstant halten. Werden komplexe Medienkomponenten, wie Hefe-Extrakt verwendet, sinkt der Bedarf an zusätzlichen Puffern, da viele komplexe Verbindungen eine hohe Pufferkapazität aufweisen. Beim Einsatz eines 25. Fermenters für die Anzucht von Mikroorganismen kann der pH-Wert auch mit gasförmigem Ammoniak reguliert werden.

Die Inkubationsdauer liegt gewöhnlich in einem Bereich von mehreren Stunden bis zu mehreren Tagen. Diese Zeit wird so ausgewählt, 30 daß sich die maximale Menge Produkt in der Brühe ansammelt. Die offenbarten Wachstumsexperimente können in einer Vielzahl von Behältern, wie Mikrotiterplatten, Glasrörchen, Glaskolben oder Glas- oder Metallfermentern unterschiedlicher Größen durchgeführt werden. Zum Screening einer großen Anzahl von Klonen sollten die 35 Mikroorganismen in Mikrotiterplatten, Glasrörchen oder Schüttelkolben entweder mit oder ohne Schikanen gezüchtet werden. Vorzugsweise werden 100-ml-Schüttelkolben verwendet, die mit 10% (bezogen auf das Volumen) des erforderlichen Wachstumsmediums gefüllt sind. Die Kolben sollten auf einem Kreiselschüttler 40 (Amplitude 25 mm) mit einer Geschwindigkeit im Bereich von 100-300 U/min geschüttelt werden. Verdampfungsverluste können durch Aufrechterhalten einer feuchten Atmosphäre verringert werden; alternativ sollte für die Verdampfungsverluste eine mathematische Korrektur durchgeführt werden.

Werden genetisch modifizierte Klone untersucht, sollten auch ein unmodifizierter Kontrollklon oder ein Kontrollklon getestet werden, der das Basisplasmid ohne Insertion enthält. Das Medium wird auf eine OD₆₀₀ von 0,5 - 1,5 angeimpft, wobei Zellen verwendet werden, die auf Agarplatten gezüchtet wurden, wie CM-Platten (10 g/l Glucose, 2,5 g/l NaCl, 2 g/l Harnstoff, 10 g/l Polypeptton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l Fleischextrakt, 22 g/l Agar pH-Wert 6,8 mit 2 M NaOH), die bei 30°C inkubiert worden sind. Das Animpfen der Medien erfolgt entweder durch Einbringen einer Kochsalzlösung von *C. glutamicum*-Zellen von CM-Platten oder durch Zugabe einer flüssigen Vorkultur dieses Bakteriums.

Beispiel 8: In-vitro-Analyse der Funktion mutierter Proteine

15 Die Bestimmung der Aktivitäten und kinetischen Parameter von Enzymen ist im Fachgebiet gut bekannt. Experimente zur Bestimmung der Aktivität eines bestimmten veränderten Enzyms müssen an die spezifische Aktivität des Wildtypenzyms angepaßt werden, was innerhalb der Fähigkeiten des Fachmann liegt. Überblicke über Enzyme im Allgemeinen sowie spezifische Einzelheiten, die die Struktur, Kinetiken, Prinzipien, Verfahren, Anwendungen und Beispiele zur Bestimmung vieler Enzymaktivitäten betreffen, können bspw. in den nachstehenden Literaturstellen gefunden werden:
Dixon, M., und Webb, E.C: (1979) Enzymes, Longmans, London;
20 Fersht (1985) Enzyme Structure and Mechanism, Freeman, New York; Walsh (1979) Enzymatic Reaction Mechanisms, Freeman, San Francisco; Price, N.C., Stevens, L. (1982) Fundamentals of Enzymology. Oxford Univ. Press: Oxford; Boyer, P.D: Hrsg. (1983) The Enzymes, 3. Aufl. Academic Press, New York; Bisswanger, H. (1994) Enzymkinetik, 2. Aufl. VCH, Weinheim (ISBN 3527300325);
30 Bergmeyer, H.U., Bergmeyer, J., Graßl, M. Hrsg. (1983-1986) Methods of Enzymatic Analysis, 3. Aufl. Bd. I-XII, Verlag Chemie: Weinheim; und Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1987) Bd. A9, "Enzymes", VCH, Weinheim, S. 352-363.

35 35 Die Aktivität von Proteinen, die an DNA binden, kann durch viele gut eingeführte Verfahren gemessen werden, wie DNA-Banden-Shift-Assays (die auch als Gelretardations-Assays bezeichnet werden). Die Wirkung dieser Proteine auf die Expression anderer Moleküle kann mit Reportergenassays (wie beschrieben in Kolmar, H. et al., (1995) EMBO J. 14: 3895-3904 und den darin zitierten Literaturstellen) gemessen werden. Reportergen-Testsysteme sind wohlbekannt und für Anwendungen in pro- und eukaryotischen Zellen etabliert, wobei Enzyme, wie beta-Galactosidase, Grün-Fluoreszenz-45 Protein und mehrere andere verwendet werden.

Die Bestimmung der Aktivität von Membran-Transportproteinen kann gemäß den Techniken, wie beschrieben in Gennis, R.B. (1989) "Pores, Channels and Transporters", in Biomembranes, Molecular Structure and Function, Springer: Heidelberg, S. 85-137; 199-234; 5 und 270-322, erfolgen.

Beispiel 9: Analyse des Einflusses von mutiertem Protein auf die Produktion des gewünschten Produktes

10 Die Wirkung der genetischen Modifikation in *C. glutamicum* auf die Produktion einer gewünschten Verbindung (wie einer Aminosäure) kann bestimmt werden, indem die modifizierten Mikroorganismen unter geeigneten Bedingungen (wie solchen, die vorstehend beschrieben sind) gezüchtet werden und das Medium und/oder die zellulären

15 Komponenten auf die erhöhte Produktion des gewünschten Produktes (d.h. einer Aminosäure) untersucht wird. Solche Analysetechniken sind dem Fachmann wohlbekannt und umfassen Spektroskopie, Dünnschichtchromatographie, Färbeverfahren verschiedener Art, enzymatische und mikrobiologische Verfahren sowie analytische Chromatographie, wie Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (s. bspw. Ullman, Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 89-90 und S. 443-613, VCH: Weinheim (1985); Fallon, A., et al., (1987) "Applications of HPLC in Biochemistry" in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17; Rehm et al. (1993)

20 Biotechnology, Bd. 3, Kapitel III: "Product recovery and purification", S. 469-714, VCH: Weinheim; Belter, P.A. et al. (1988) Bioseparations: downstream processing for Biotechnology, John Wiley and Sons; Kennedy, J.F. und Cabral, J.M.S. (1992) Recovery processes for biological Materials, John Wiley and Sons;

25 Shaeiwitz, J.A. und Henry, J.D. (1988) Biochemical Separations, in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. B3; Kapitel 11, S. 1-27, VCH: Weinheim; und Dechow, F.J. (1989) Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications).

30 Zusätzlich zur Messung des Fermentationsendproduktes ist es ebenfalls möglich, andere Komponenten der Stoffwechselwege zu analysieren, die zur Produktion der gewünschten Verbindung verwendet werden, wie Zwischen- und Nebenprodukte, um die Gesamt-Produktivität des Organismus, die Ausbeute und/oder die Effizienz der Produktion der Verbindung zu bestimmen. Die Analyseverfahren umfassen Messungen der Nährstoffmengen im Medium (bspw. Zucker, Kohlenwasserstoffe, Stickstoffquellen, Phosphat und andere Ionen), Messungen der Biomassezusammensetzung und des Wachstums,

35 Analyse der Produktion gewöhnlicher Metabolite aus Biosynthesewegen und Messungen von Gasen, die während der Fermentation erzeugt werden. Standardverfahren für diese Messungen sind in

Applied Microbial Physiology; A Practical Approach, P.M. Rhodes und P.F. Stanbury, Hrsg. IRL Press, S. 103-129; 131-163 und 165-192 (ISBN: 0199635773) und den darin angegebenen Literaturstellen beschrieben.

5

Beispiel 10: Reinigung des gewünschten Produktes aus *C. glutamicum*-Kultur

Die Gewinnung des gewünschten Produktes aus *C. glutamicum*-Zellen 10 oder aus dem Überstand der vorstehend beschriebenen Kultur kann durch verschiedene, im Fachgebiet bekannte Verfahren erfolgen. Wird das gewünschte Produkt von den Zellen nicht sezerniert, können die Zellen aus der Kultur durch langsame Zentrifugation geerntet werden, die Zellen können durch Standard-Techniken, wie 15 mechanische Kraft oder Ultrabeschallung, lysiert werden. Die Zelltrümmer werden durch Zentrifugation entfernt, und die Überstandsfraktion, die die löslichen Proteine enthält, wird zur weiteren Reinigung der gewünschten Verbindung erhalten. Wird das Produkt von den *C. glutamicum*-Zellen sezerniert, werden die 20 Zellen durch langsame Zentrifugation aus der Kultur entfernt, und die Überstandsfraktion wird zur weiteren Reinigung behalten.

Die Überstandsfraktion aus beiden Reinigungsverfahren wird einer Chromatographie mit einem geeigneten Harz unterworfen, wobei das 25 gewünschte Molekül entweder auf dem Chromatographieharz zurückgehalten wird, viele Verunreinigungen in der Probe jedoch nicht, oder wobei die Verunreinigungen auf dem Harz zurückbleiben, die Probe hingegen nicht. Diese Chromatographieschritte können nötigenfalls wiederholt werden, wobei die gleichen oder andere 30 Chromatographieharze verwendet werden. Der Fachmann ist in der Auswahl der geeigneten Chromatographieharze und der wirksamsten Anwendung für ein bestimmtes, zu reinigendes Molekül bewandert. Das gereinigte Produkt kann durch Filtration oder Ultrafiltration konzentriert und bei einer Temperatur aufbewahrt werden, bei der 35 die Stabilität des Produktes maximal ist.

Im Fachgebiet sind viele Reinigungsverfahren bekannt, die nicht auf das vorhergehende Reinigungsverfahren eingeschränkt sind. Diese sind bspw. beschrieben in Bailey, J.E. & Ollis, D.F. 40 Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw-Hill: New York (1986).

Die Identität und Reinheit der isolierten Verbindungen kann durch Standard-Techniken des Fachgebiets bestimmt werden. Diese umfassen Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), spektroskopische Verfahren, Färbeverfahren, Dünnschichtchromatographie, 45 NIRS, Enzymtest oder mikrobiologische Tests. Diese Analysever-

59

61

fahren sind zusammengefaßt in: Patek et al. (1994) Appl. Environ. Microbiol. 60: 133-140; Malakhova et al. (1996) Biotekhnologiya 11: 27-32; und Schmidt et al. (1998) Bioprocess Engineer. 19: 67-70. Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1996) Bd.

5 A27, VCH: Weinheim, S. 89-90, S. 521-540, S. 540-547, S. 559-566, 575-581 und S. 581-587; Michal, G (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley and Sons; Fallon, A. et al. (1987) Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology,

10 Bd. 17.

Äquivalente

Der Fachmann erkennt oder kann - indem er lediglich Routine-
15 verfahren verwendet - viele Äquivalente der erfindungsgemäßen spezifischen Ausführungsformen feststellen. Diese Äquivalente sollen von den nachstehenden Patentansprüchen umfaßt sein.

20

25

30

35

40

45

Patentansprüche

1. Isoliertes Nukleinsäuremolekül aus *Corynebacterium glutamicum*, das ein MCT-Protein oder einen Abschnitt davon codiert.
2. Isoliertes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, wobei das Nukleinsäuremolekül ein MCT-Protein codiert, welches an der Produktion einer Feinchemikalie beteiligt ist.
3. Isoliertes Nukleinsäuremolekül aus *Corynebacterium glutamicum*, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den in Anhang A aufgeführten Sequenzen oder einem Abschnitt davon.
4. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, das eine Polypeptidsequenz codiert, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den in Anhang B angegebenen Sequenzen.
5. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, das eine natürlich vorkommende allelische Variante eines Polypeptides codiert, ausgewählt aus der Gruppe von Aminosäuresequenzen, bestehend aus den in Anhang B aufgeführten Sequenzen.
6. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, umfassend eine Nukleotidsequenz, die zu mindestens 50% zu einer Nukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den in Anhang A angegebenen Sequenzen oder einem Abschnitt davon, homolog ist.
7. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, umfassend ein Fragment mit mindestens 15 Nukleotiden einer Nukleinsäure mit einer Nukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den in Anhang A angegebenen Sequenzen.
8. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, das unter stringenten Bedingungen an ein Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1-7 hybridisiert.
9. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, umfassend das Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1-8 oder einen Abschnitt davon und eine Nukleotidsequenz, die ein heterologes Polypeptid codiert.

63

10. Vektor, umfassend das Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1-9.
11. Vektor nach Anspruch 10, welcher ein Expressionsvektor ist.
- 5 12. Wirtszelle, die mit dem Expressionsvektor nach Anspruch 11 transfiziert ist.
- 10 13. Wirtszelle nach Anspruch 12, wobei die Zelle ein Mikroorganismus ist.
14. Wirtszelle nach Anspruch 13, wobei die Zelle zur Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* gehört.
- 15 15. Wirtszelle nach Anspruch 12, wobei die Expression des Nukleinsäuremoleküls eine Modulation der Produktion einer Feinchemikalie von der Zelle bewirkt.
- 20 16. Wirtszelle nach Anspruch 15, wobei die Feinchemikalie ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus organischen Säuren, proteinogenen und nichtproteinogenen Aminosäuren, Purin- und Pyrimidinbasen, Nukleosiden, Nukleotiden, Lipiden, gesättigten und ungesättigten Fettsäuren, Diolen, Kohlehydraten, aromatischen Verbindungen, Vitaminen, Cofaktoren und Enzymen.
- 25 17. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptides, umfassend das Züchten der Wirtszelle nach Anspruch 12 in einem geeigneten Kulturmedium, um so das Polypeptid zu produzieren.
- 30 18. Isoliertes MCT-Polypeptid aus *Corynebacterium glutamicum* oder ein Abschnitt davon.
19. Polypeptid nach Anspruch 18, wobei das Polypeptid an der Produktion einer Feinchemikalie beteiligt ist.
- 35 20. Isoliertes Polypeptid, umfassend eine Aminosäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den in Anhang B angegebenen Sequenzen.
- 40 21. Isoliertes Polypeptid, umfassend eine natürlich vorkommende allelische Variante eines Polypeptides, umfassend eine Aminosäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den in Anhang B angegebenen Sequenzen, oder einen Abschnitt davon.
- 45 22. Isoliertes Polypeptid nach einem der Ansprüche 18-21, das zudem heterologe Aminosäuresequenzen umfaßt.

23. Isoliertes Polypeptid, das von einem Nukleinsäuremolekül codiert wird, umfassend eine Nukleotidsequenz, die mindestens zu 50% homolog zu einer Nukleinsäure ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den in Anhang A angegebenen Sequenzen.
5
24. Isoliertes Polypeptid, umfassend eine Aminosäuresequenz, die mindestens zu 50% homolog zu einer Aminosäuresequenz ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den in Anhang B angegebenen Sequenzen.
10
25. Verfahren zur Herstellung einer Feinchemikalie, umfassend das Züchten einer Zelle, die einen Vektor nach Anspruch 12 enthält, so daß die Feinchemikalie produziert wird.
15
26. Verfahren nach Anspruch 25, wobei das Verfahren zudem den Schritt Gewinnen der Feinchemikalie aus der Kultur umfaßt.
20
27. Verfahren nach Anspruch 25, wobei das Verfahren zudem den Schritt Transfizieren der Zelle mit dem Vektor nach Anspruch 11 umfaßt, so daß eine Zelle erhalten wird, die den Vektor enthält.
25
28. Verfahren nach Anspruch 25, wobei die Zelle zur Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* gehört.
30
29. Verfahren nach Anspruch 25, wobei die Zelle ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium herculis*, *Corynebacterium lilium*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Corynebacterium acetophilum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium fujikense*, *Corynebacterium nitrilophilus*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Brevibacterium butanicum*, *Brevibacterium divaricatum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium healii*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, *Brevibacterium ketosoreductum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium paraffinolyticum* und den in Tabelle 3 angegebenen Stämmen.
35
30. Verfahren nach Anspruch 25; wobei die Expression des Nukleinsäuremoleküls aus dem Vektor die Modulation der Produktion der Feinchemikalie bewirkt.
40
31. Verfahren nach Anspruch 25, wobei die Feinchemikalie ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus organischen Säuren, proteinogenen und nichtproteinogenen Aminosäuren, Purin- und Pyrimidinbasen, Nukleosiden, Nukleotiden, Lipiden, gesättig-
45

ten und ungesättigten Fettsäuren, Diolen, Kohlehydraten, aromatischen Verbindungen, Vitaminen, Cofaktoren und Enzymen.

32. Verfahren nach Anspruch 25, wobei die Feinchemikalie eine 5 Aminosäure ist.

33. Verfahren nach Anspruch 32, wobei die Aminosäure aus der Gruppe stammt, bestehend aus Lysin, Glutamat, Glutamin, Alanin, Aspartat, Glycin, Serin, Threonin, Methionin, 10 Cystein, Valin, Leucin, Isoleucin, Arginin, Prolin, Histidin, Tyrosin; Phenylalanin und Tryptophan.

34. Verfahren zur Herstellung einer Feinchemikalie, umfassend das 15 Züchten einer Zelle, deren genomische DNA durch Einschluß eines Nukleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 1-9 verändert worden ist.

20

25

30

35

40

45

Tabelle 1: Gene der Patentanmeldung
ABC-Transporter

	ID #	Contig	NT Start	NT Stop	Funktion des Gens
5	RXN00164	VV0232	1782	94	Hypothetischer ABC Transporter ATP-Bindendes Protein
	RXN00733	VV0132	1647	2531	Hypothetischer ABC Transporter ATP-Bindendes Protein
10	RXN01191	VV0169	10478	12067	Hypothetischer ABC Transporter ATP-Bindendes Protein
	RXN01212	VV0169	3284	4207	Hypothetischer ABC Transporter ATP-Bindendes Protein
15	RXN01602	VV0229	1109	2638	Hypothetischer ABC Transporter ATP-Bindendes Protein
	RXN01881	VV0105	529	95	Hypothetischer ABC Transporter ATP-Bindendes Protein
20	RXN01946	VV0228	2	1276	Hypothetischer ABC Transporter ATP-Bindendes Protein
	RXN02515	VV0087	962	1717	Hypothetischer ABC Transporter ATP-Bindendes Protein
25	RXN00525	VV0079	26304	27566	Hypothetischer ABC Transporter Permease Protein
	RXN02096	VV0126	20444	22135	Hypothetischer ABC Transporter Permease Protein
30	RXN00412	VV0086	53923	52844	Hypothetischer Aminosäure ABC Transporter ATP-Bindendes Protein
	RXN00411	VV0086	52844	52170	Hypothetischer Aminosäure ABC Transporter Permease Protein
35	RXN00243	VV0057	28915	27899	, P, G, R ATPase Untereinheiten von ABC transportern
	RXN00456	VV0076	6780	8156	, P, G, R ATPase Untereinheiten von ABC transportern
40	RXN01604	VV0137	8117	7470	, P, G, R ATPase Untereinheiten von ABC transportern
	RXN02547	VV0057	27726	25588	, P, G, R ATPase Untereinheiten von ABC transportern
45	RXN02614	VV0313	5964	5236	TAURIN TRANSPORT ATP-BINDENDES PROTEIN TAUB
	RXN02613	VV0313	5223	4267	TAURIN-BINDENDES PERIPLASMIC PRO- TEIN PRECURSOR
	RXN00368	VV0226	2300	726	SPERMIDIN/PUTRESCIN TRANSPORT ATP- BINDENDES PROTEIN POTA
	RXN01285	VV0215	1780	1055	EISENHALTIGES ENTEROBACTIN TRANS- PORT ATP-BINDENDES PROTEIN FEPC
	RXN00523	VV0194	1363	338	EISENHALTIGES ENTEROBACTIN TRANS- PORT PROTEIN FEPG
	RXN01142	VV0077	5805	6302	NITRAT TRANSPORT ATP-BINDENDES PROTEIN NRTD
	RXN01141	VV0077	4644	5468	NITRAT TRANSPORT PROTEIN NRTA
	RXN02074	VV0318	12775	11153	TRANSPORT ATP-BINDENDES PROTEIN CYDD
	RXN01002	VV0106	8858	8055	PHOSPHONATE TRANSPORT ATP-BINDEN- DES PROTEIN PHNC

61

65

	ID #	Contig	NT Start	NT Stop	Funktion des Gens
5	RXN01000	VV0106	7252	6407	PHOSPHONATE TRANSPORT SYSTEM PERMEASE PROTEIN PHNE
	RXN01732	VV0106	9944	8895	PHOSPHONATE-BINDENDES PERIPLASMISCHER PROTEIN VORLÄUFER
	RXN03080	VV0045	1670	2449	EISENHALTIGES ENTEROBACTIN TRANSPORT ATP-BINDENDES PROTEIN FEPC
10	RXN03081	VV0045	2476	2934	EISENENTEROBACTIN-BINDENDES PERIPLASMIC PROTEIN VORLÄUFER
	RXN03082	VV0045	3131	3451	EISENENTEROBACTIN-BINDENDES PERIPLASMIC PROTEIN VORLÄUFER

15

20

25

30

35

40

45

Tabelle 2

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
A09073	ppg	Phosphoenolpyruvatecarboxylase	Bachmann, B. et al. "DNA fragment coding for phosphoenolpyruvate carboxylase, recombinant DNA carrying said fragment, strains carrying the recombinant DNA and method for producing L-amino acids using said strains," Patent: EP 0358940-A 3 03/21/90
A45579, A45581, A45583, A45585 A45587		Threoninehydratase	Moeckel, B. et al. "Production of L-isoleucine by means of recombinant micro-organisms with deregulated threonine dehydratase," Patent: WO 9519442-A 5 07/20/95
AB003132	inurC; ftsQ; ftsZ		Kobayashi, M. et al. "Cloning, sequencing, and characterization of the ftsZ gene from coryneform bacteria," <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 236(2):383-388 (1997)
AB015023	inurC; ftsQ		Wachi, M. et al. "A murC gene from Coryneform bacteria," <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> , 51(2):223-228 (1999)
AB018530	disR		Kimura, E. et al. "Molecular cloning of a novel gene, disR, which rescues the detergent sensitivity of a mutant derived from <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ," <i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i> , 60(10):1565-1570 (1996)
AB018531	disR1; disR2		
AB020624	muri	D-Glutamatracemase	
AB023377	lki	Transketolase	
AB024708	gltB; gltD	Glutamin-2-oxoglutarataminotransferase große und kleine Untereinheiten	
AB025424	acn	Aconitase	
AB027714	rep	Replikationsprotein	
AB027715	rep; aad	Replikationsprotein; Aminoglycosid- adenyltransferase	

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
AF005242	argC	N-Acetylglutamat-5-semialdehyde-dehydrogenase	
AF005635	glnA	Glutamin synthetase	
AF030405	hisF	Cyclase	
AF030520	argG	Argininosuccinatesynthetase	
AF031518	argF	Ornithincarboxamolytransferase	
AF036932	aroD	3-Dehydroquinolaldehydehydrolase	
AF038548	pyc	Pyruvatecarboxylase	
AF038651	dciAE; apt; rel	Dipeptid-bindendes Protein; Adenin-phosphoribosyltransferase; GTP-pyrophosphokinase	Wehmeyer, L. et al. "The role of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> rel gene in (p)ppGpp metabolism," <i>Microbiology</i> , 144:1853-1862 (1998)
AF041436	argR	Arginine-Repressor	
AF045998	impA	Inositolmonophosphatephosphatase	
AF048764	argH	Argininosuccinatlyase	
AF049897	argC; argJ; argB; argD; argF; argR; argG; argH	N-(Acetylglutamyl)phosphatereduktaise; Ornithinacyltransferase; N-(Acetyl)-glutamakinas; Acetylornithin-transaminase; Ornithin-carbamoyltransferase; Arginimrepressor; Argininosuccinatlyase; Argininosuccinatlyase	
AF050109	inhA	Enoyl-acyl-Carrierprotein-Reductase	
AF050166	hisG	ATP-Phosphoribosyltransferase	
AF051846	hisA	Phosphoribosylformimino-5-amino-1-phosphoribosyl-4-imidazolecarboxamide isomerase	
AF052652	metA	Homoserin-O-acetyltransferase	Park, S. et al. "Isolation and analysis of metA, a methionine biosynthetic gene encoding homoserine acetyltransferase in <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>Mol. Cells.</i> , 8(3):286-294 (1998)
AF053071	aroB	Dehydrochinat synthetase	
AF060558	hisH	Glutaminamidotransferase	

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
AF086704	hisE	Phosphoribosyl-ATP-pyrophospho- hydrolase	
AF114233	aroA	5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphat synthase	Dusch, N. et al. "Expression of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> panD gene encoding L-aspartate- α -decarboxylase leads to pantothenate over- production in <i>Escherichia coli</i> ," <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 65(4):1530-1539 (1999)
AF116184	panD	L-Aspartat- α -decarboxylase-Vorstufe	
AF124518	aroD; aroE	3-Dihydrochinase; Shikimatehydrogenase	
AF124600	aroC; aroK; aroB; pepQ	Chorismatsynthase; Shikimatekinase; 3-Dihydrochinat synthase; mutinästliche Cytoplasmapeptidase	
AF145897	inhA		
AF145898	inhA		
AJ001436	ectP	Transport von Ectoine, Glycin, Betain, Prolin	Peter, H. et al. "Corynebacterium glutamicum is equipped with four secondary carriers for compatible solutes: Identification, sequencing, and characterization of the proline/ectoine uptake system, ProP, and the ectoine/ proline/glycine betaine carrier, EctP," <i>J. Bacteriol.</i> 180(22):6005-6012 (1998)
AJ004934	dapD	Tetrahydrodipicolinatsuccinylase (unvollständig)	Wehnmann, A. et al. "Different modes of diaminopimelate synthesis and their role in cell wall integrity: A study with <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>J. Bacteriol.</i> 180(12):3159-3165 (1998)
AJ007732	ppc; secG; aint; ocd; soxA	Phosphoenolpyruvatcarboxylase; ?; High affinity-Ammonium-Aufnahmeprotein; mutinästliche Ornithin-cyclodecarboxylase; Sarcosinioxidase	Beteiligt an Zellteilung; PII protein;
AJ010319	ftsY; glnB; glnD; strP; amtP	uridyltransferase (Uridyl- β -entferndes Enzym); Signalerkennungspartikel; Low affinity-Ammonium-Aufnahmeprotein	Jakoby, M. et al. "Nitrogen regulation in <i>Corynebacterium glutamicum</i> ; Isolation of genes involved in biochemical characterization of corresponding proteins," <i>FEMS Microbiol.</i> , 173(2):303-310 (1999)
AJ132968	cat	Chloramphenicol-acetyltransferase	

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
AJ224946	mqo	L-malate: Chinonoxidoreductase	Molenaar, D. et al. "Biochemical and genetic characterization of the membrane-associated malate dehydrogenase (acceptor) from <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>Eur. J. Biochem.</i> , 254(2):395-403 (1998)
AJ238250	ndh	NADH-dehydrogenase	Lichtinger, T. et al. "Biochemical and biophysical characterization of the cell wall porin of <i>Corynebacterium glutamicum</i> : The channel is formed by a low molecular mass polypeptide," <i>Biochemistry</i> , 37(43):15024-15032 (1998)
AJ238703	porA	Porin	Vertes, A.A. et al. "Isolation and characterization of IS31831, a transposable element from <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>Mol. Microbiol.</i> , 11(4):739-746 (1994)
D17429		Transposables Element IS31831	Usuda, Y. et al. "Molecular cloning of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> (Brevibacterium lactofermentum AJ12036) odhA gene encoding a novel type of 2-oxoglutarate dehydrogenase," <i>Microbiology</i> , 142:3347-3354 (1996)
D84102	odhA	2-Oxoglutaratehydrogenase	Kaisumata, R. et al. "Production of L-threonine and L-isoleucine," Patent: JP 10987232392-A 1 10/12/87
E01358	hdh; hk	Homoserindehydrogenase; Homoserin-kinase	Kaisumata, R. et al. "Production of L-threonine and L-isoleucine," Patent: JP 10987232392-A 2 10/12/87
E01359		Stronaufwärts des Startcodons des Homoserinkinase-Gens	
E01375		Tryptophan-Operon	Matsui, K. et al. "Tryptophan operon, peptide and protein coded thereby, utilization of tryptophan operon gene expression and production of tryptophan," Patent: JP 1987244382-A 1 10/24/87
E01376	ttrL; ttrE	Leader-Peptid; Anthranilatsynthase	Matsui, K. et al. "Tryptophan operon, peptide and protein coded thereby, utilization of tryptophan operon gene expression and production of tryptophan," Patent: JP 1987244382-A 1 10/24/87
E01377		Promotor- und Operator-Bereiche des Tryptophan-Operons	Hatakeyama, K. et al. "DNA fragment containing gene capable of coding biotin synthetase and its utilization," Patent: JP 19922778088-A 1 10/02/92
E03937		Biotinsynthase	Kohama, K. et al. "Gene coding diaminopelargonic acid aminotransferase and desthiobiotin synthetase and its utilization," Patent: JP 1992330284-A 1 11/18/92
E04040		Diaminopelargonsäureaminotransferase	

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
E04041	Desthiobiotinsynthetase	Kohama, K. et al. "Gene coding diaminopelargonic acid aminotransferase and desthiobiotin synthetase and its utilization," Patent: JP 19923330284-A 1 11/18/92	
E04307	Flavum aspartase	Kurusu, Y. et al. "Gene DNA coding aspartase and utilization thereof," Patent: JP 1993030977-A 1 02/01/93	
E04376	Isocitratlyase	Katsunata, R. et al. "Gene manifestation controlling DNA," Patent: JP 1993056782-A 3 03/09/93	
E04377	Isocitratlyase N-terminales Fragment	Katsunata, R. et al. "Gene manifestation controlling DNA," Patent: JP 1993056782-A 3 03/09/93	
E04484	Prephenatdehydrolase	Sotouchi, N. et al. "Production of L-phenylalanine by fermentation," Patent: JP 1993076352-A 2 03/30/93	
E05108	Aspartokinase	Fugono, N. et al. "Gene DNA coding Aspartokinase and its use," Patent: JP 1993184366-A 1 07/27/93	
E05112	Dihydro-dipichorinatsynthetase	Hatakeyama, K. et al. "Gene DNA coding dihydrodipicolinic acid synthetase and its use," Patent: JP 1993184371-A 1 07/27/93	
E05776	Diaminopimelinsäureddehydrolase	Kobayashi, M. et al. "Gene DNA coding Diaminopimelic acid dehydrogenase and its use," Patent: JP 1993284970-A 1 11/02/93	
E05779	Threoninsynthase	Kohama, K. et al. "Gene DNA coding threonine synthase and its use," Patent: JP 1993284972-A 1 11/02/93	
E06110	Prephenatdehydrolase	Kikuchi, T. et al. "Production of L-phenylalanine by fermentation method," Patent: JP 1993344881-A 1 12/27/93	
E06111	mutierte Prephenatdehydrolase	Kikuchi, T. et al. "Production of L-phenylalanine by fermentation method," Patent: JP 1993344881-A 1 12/27/93	
E06146	Acetohydroxysäuresynthetase	Inui, M. et al. "Gene capable of coding Acetohydroxy acid synthetase and its use," Patent: JP 1993344893-A 1 12/27/93	
E06825	Aspartokinase	Sugimoto, M. et al. "Mutant aspartokinase gene," Patent: JP 1994062866-A 1 03/08/94	
E06826	mutierte Aspartokinase alpha-Untereinheit	Sugimoto, M. et al. "Mutant aspartokinase gene," Patent: JP 1994062866-A 1 03/08/94	

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
E06827	mutierte Aspartokinase alpha-Untereinheit	Sugimoto, M. et al. "Mutant aspartokinase gene," patent: JP 1994062866-A 1 03/08/94	
E07701	secY	Honno, N. et al. "Gene DNA participating in integration of membranous protein to membrane," Patent: JP 1994169780-A 1 06/21/94	
E08177	Aspartokinase	Sato, Y. et al. "Genetic DNA capable of coding Aspartokinase released from feedback inhibition and its utilization," Patent: JP 1994261766-A 1 09/20/94	
E08178, E08179, E08180, E08181, E08182	Durch Rückkopplungshemmung freigesetzte Aspartokinase	Sato, Y. et al. "Genetic DNA capable of coding Aspartokinase released from feedback inhibition and its utilization," Patent: JP 1994261766-A 1 09/20/94	
E08232	Acetohydroxysäureisomerase	Inui, M. et al. "Gene DNA coding acetohydroxy acid isomerase," Patent: JP 1994277067-A 1 10/04/94	
E08234	secE	Asai, Y. et al. "Gene DNA coding for translocation machinery of protein," Patent: JP 1994277073-A 1 10/04/94	
E08643	FT-Aminotransferase und Desthiobiotin-Synthetase-Promotorbereich	Hatakeyama, K. et al. "DNA fragment having promoter function in coryneform bacterium," Patent: JP 1995031476-A 1 02/03/95	
E08646	Biotinsynthetase	Hatakeyama, K. et al. "DNA fragment having promoter function in coryneform bacterium," Patent: JP 1995031476-A 1 02/03/95	
E08649	Aspartase	Kohama, K. et al. "DNA fragment having promoter function in coryneform bacterium," Patent: JP 1995031478-A 1 02/03/95	
E08900	Dihydrodipicolinate	Madori, M. et al. "DNA fragment containing gene coding Dihydrodipicolinate acid reductase and utilization thereof," Patent: JP 1995075578-A 1 03/20/95	
E08901	Diaminopimelinsäuredcarboxylase	Madori, M. et al. "DNA fragment containing gene coding Diaminopimelic acid decarboxylase and utilization thereof," Patent: JP 1995075579-A 1 03/20/95	
E12594	Serinhydroxymethyltransferase	Hatakeyama, K. et al. "Production of L-tryptophan," Patent: JP 1997028391-A 1 02/04/97	
E12760, E12759, E12758	Transposase	Moriya, M. et al. "Amplification of gene using artificial transposon," Patent: JP 1997070291-A 03/18/97	

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
E12764		Arginy-tRNA synthetase; Diaminopimelin-säuredcarboxylase	Moriya, M. et al. "Amplification of gene using artificial transposon," Patent: JP 1997070291-A 03/18/97
E12767		Dihydrodipicolinsäuresynthetase	Moriya, M. et al. "Amplification of gene using artificial transposon," Patent: JP 1997070291-A 03/18/97
E12770		Aspartokinase	Moriya, M. et al. "Amplification of gene using artificial transposon," Patent: JP 1997070291-A 03/18/97
E12773		Dihydrodipicolinsäureductase	Moriya, M. et al. "Amplification of gene using artificial transposon," Patent: JP 1997070291-A 03/18/97
E13655		Glucose-6-phosphatedehydrogenase	Hatakeyama, K. et al. "Glucose-6-phosphate dehydrogenase and DNA capable of coding the same," Patent: JP 1997224661-A 1 09/02/97
L01508	IlvA	Threonindehydrtase	Moeckel, B. et al. "Functional and structural analysis of the threonine dehydratase of <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>J. Bacteriol.</i> , 174:8065-8072. (1992)
L07603	EC 4.2.1.15	3-Desoxy-D-arabinohexulosonat-7-phosphatsynthase	Chen, C. et al. "The cloning and nucleotide sequence of <i>Corynebacterium glutamicum</i> 3-deoxy-D-arabinohexulosonate-7-phosphate synthase gene," <i>FEMS Microbiol. Lett.</i> , 107:223-230 (1993)
L09232	IlvB; ilvN; ilvC	Acetohydroxysäuresynthase, froße Unter-einheit; Acetohydroxysäuresynthase kleine Unter-einheit; Acetohydroxysäure-isomero-reductase	Keilhauer, C. et al. "Isoleucine synthesis in <i>Corynebacterium glutamicum</i> : molecular analysis of the ilvB-ilvN-ilvC operon," <i>J. Bacteriol.</i> , 175(17):5595-5603 (1993)
L18874	PtsM	Phosphoenolpyruvat-Zuckerphosphotransferase	Fouet, A. et al. "Bacillus subtilis sucrose-specific enzyme II of the phosphotransferase system: expression in <i>Escherichia coli</i> and homology to enzymes II from enteric bacteria," <i>PNAS USA</i> , 84(24):8773-8777 (1987); Lee, J.K. et al. "Nucleotide sequence of the gene encoding the <i>Corynebacterium glutamicum</i> mannose enzyme II and analyses of the deduced protein sequence," <i>FEMS Microbiol. Lett.</i> , 119(1-2):137-145 (1994)
L27123	aceB	Malatsynthase	Lee, H-S. et al. "Molecular characterization of aceB, a gene encoding malate synthase in <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>J. Microbiol. Biotechnol.</i> , 4(4):256-263 (1994)

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
L27126		Pyruvatkinase	Jetten, M. S. et al. "Structural and functional analysis of pyruvate kinase from <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> , 60(7):2501-2507 (1994)
L28760	aceA	Isocitratlyase	
L35906	dtxR	Diphtherietoxinrepressor	Oguiza, J.A. et al. "Molecular cloning, DNA sequence analysis, and characterization of the <i>Corynebacterium diphtheriae</i> dtxR from <i>Brevibacterium laevofermentum</i> ," <i>J. Bacteriol.</i> , 177(2):465-467 (1995)
M13774		Prephenatdehydratase	Follettie, M.T. et al. "Molecular cloning and nucleotide sequence of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> pheA gene," <i>J. Bacteriol.</i> , 167:695-702 (1986)
M16175	5S rRNA		Park, Y.-H. et al. "Phylogenetic analysis of the coryneform bacteria by 5S rRNA sequences," <i>J. Bacteriol.</i> , 169:1801-1806 (1987)
M16663	ttrpE	Anthranilate synthase, 5'-Ende	Sano, K. et al. "Structure and function of the trp operon control regions of <i>Brevibacterium laevofermentum</i> , a glutamic-acid-producing bacterium," <i>Gene</i> , 52:191-200 (1987)
M16664	ttrpA	Tryptophansynthase, 3'-Ende	Sano, K. et al. "Structure and function of the trp operon control regions of <i>Brevibacterium laevofermentum</i> , a glutamic-acid-producing bacterium," <i>Gene</i> , 52:191-200 (1987)
M25819		Phosphoenolpyruvatecarboxylase	O'Regan, M. et al. "Cloning and nucleotide sequence of the Phosphoenol-pyruvate carboxylase-coding gene of <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13032," <i>Gene</i> , 77(2):237-251 (1989)
M85106		23S rRNA-Gen-Insertionssequenz	Roller, C. et al. "Gram-positive bacteria with a high DNA G+C content are characterized by a common insertion within their 23S rRNA genes," <i>J. Gen. Microbiol.</i> , 138:1167-1175 (1992)
M85107, M85108		23S rRNA-Gen-Insertionssequenz	Roller, C. et al. "Gram-positive bacteria with a high DNA G+C content are characterized by a common insertion within their 23S rRNA genes," <i>J. Gen. Microbiol.</i> , 138:1167-1175 (1992)

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
M89931	aecD; bnmQ; yhbw	Beta C-S lyase; Verzweigketten-Aminosäure-Aufnahmecarrier; hypothetisches Protein yhbw	Rossol, I. et al. "The Corynebacterium glutamicum aecD gene encodes a C-S lyase with alpha, beta-elimination activity that degrades aminoethylcysteine," <i>J. Bacteriol.</i> , 174(9):2968-2977 (1992); Tauch, A. et al. "Isoleucine uptake in Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 is directed by the bnmQ gene product," <i>Arch. Microbiol.</i> , 169(4):303-312 (1998)
S59299	trp	Leader-Gen (Promotor)	Henry, D. M. et al. "Cloning of the trp gene cluster from a tryptophan-hyperproducing strain of Corynebacterium glutamicum: identification of a mutation in the trp leader sequence," <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> , 59(3):791-799 (1993)
U11545	trpD	Anthranilatephosphoribosyltransferase	O'Gara, J.P. and Dunican, L.K. (1994) Complete nucleotide sequence of the Corynebacterium glutamicum ATCC 21850 trpD gene." Thesis, Microbiology Department, University College Galway, Ireland.
U13922	cglM; cglR; cglIIR	mutmaßliche Typ II 5-Cytosin-methyltransferase; mutmaßliche Type II Restriktionsendonuklease; mutmaßliche Typ I- oder Typ III Restriktions-endonuklease	Schafer, A. et al. "Cloning and characterization of a DNA region encoding a stress-sensitive restriction system from Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 and analysis of its role in intergeneric conjugation with Escherichia coli," <i>J. Bacteriol.</i> , 176(23):7309-7319 (1994); Schafer, A. et al. "The Corynebacterium glutamicum cglM gene encoding a 5-cytosine in an McrBC-deficient Escherichia coli strain," <i>Gene</i> , 203(2):95-101 (1997)
U14965	recA		Ankri, S. et al. "Mutations in the Corynebacterium glutamicum proline biosynthetic pathway: A natural bypass of the proA step," <i>J. Bacteriol.</i> , 178(15):4412-4419 (1996)
U31224	ppx		Ankri, S. et al. "Mutations in the Corynebacterium glutamicum proline biosynthetic pathway: A natural bypass of the proA step," <i>J. Bacteriol.</i> , 178(15):4412-4419 (1996)
U31225	proC	L-Prolin: NADP+ 5-Oxidoreduktase	Ankri, S. et al. "Mutations in the Corynebacterium glutamicum proline biosynthetic pathway: A natural bypass of the proA step," <i>J. Bacteriol.</i> , 178(15):4412-4419 (1996)
U31230	obj; proB; unkdh	?; Gamma glutamylkinase; ähnlich den D-isomerspezifischen 2-Hydroxsäure-dehydrogenasen	Ankri, S. et al. "Mutations in the Corynebacterium glutamicum proline biosynthetic pathway: A natural bypass of the proA step," <i>J. Bacteriol.</i> , 178(15):4412-4419 (1996)
U31281	bioB	Biotinsynthase	Serebrisskii, I.G., "Two new members of the bio B superfamily: Cloning, sequencing and expression of bio B genes of <i>Methylobacteriaceus</i> flagellatum and <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>Gene</i> , 175:15-22 (1996)

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
U35023	thtR; accBC	Thiosulfat-schweifeltransferase; Acyl CoA-Carboxylase	Jager, W. et al. "A <i>Corynebacterium glutamicum</i> gene encoding a two-domain protein similar to biotin carboxylases and biotin-carboxyl-carrier proteins," <i>Arch. Microbiol.</i> , 166(2):76-82 (1996)
U43535	cnr	Multidrug-Resistenzprotein	Jager, W. et al. "A <i>Corynebacterium glutamicum</i> gene conferring multidrug resistance in the heterologous host <i>Escherichia coli</i> ," <i>J. Bacteriol.</i> , 179(7):2449-2451 (1997)
U43536	clpB	Hitzeschock-ATP-Bindungsprotein	
U53587	aphA-3	3'S'-Aminoglycosidphosphotransferase	
U89648		Nicht identifizierte <i>Corynebacterium glutamicum</i> -Sequenz, die an der Histidin-biosynthese beteiligt ist, partielle Sequenz	
X04960	trpA; trpB; trpC; trpD; trpE; trpG; trpL	Tryptophanoperon	Matsui, K. et al. "Complete nucleotide and deduced amino acid sequences of the <i>Brevibacterium lactofermentum</i> tryptophan operon," <i>Nucleic Acids Res.</i> , 14(24):10113-10114 (1986)
X07563	lys A	DAP-Decarboxylase (meso-diaminopimelate-decarboxylase, EC 4.1.1.20)	Yeh, P. et al. "Nucleic sequence of the lysA gene of <i>Corynebacterium glutamicum</i> and possible mechanisms for modulation of its expression," <i>Mol. Gen. Genet.</i> , 212(1):112-119 (1988)
X14234	EC 4.1.1.31	Phosphoenolpyruvatecarboxylase	Eikmanns, B.J. et al. "The Phosphoenolpyruvate carboxylase gene of <i>Corynebacterium glutamicum</i> : Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression," <i>Mol. Gen. Genet.</i> , 218(2):330-339 (1989); Lepiniec, L. et al. "Sorghum Phosphoenolpyruvate carboxylase gene family: structure, function and molecular evolution," <i>Plant. Mol. Biol.</i> , 21 (3):487-502 (1993)
X17313	fda	Fructose-bisphosphataldolase	Von der Osten, C.H. et al. "Molecular cloning, nucleotide sequence and fine-structural analysis of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> fda gene: structural comparison of C. glutamicum fructose-1,6-biphosphate aldolase to class I and class II aldolases," <i>Mol. Microbiol.</i>
X53993	dapA	L-2, 3-Dihydrodipicolinaltsynthetase (EC 4.2.1.52)	Bonnassie, S. et al. "Nucleic sequence of the dapA gene from <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>Nucleic Acids Res.</i> , 18(21):6421 (1990)

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
X54223		AttB-verwandte Stelle	Cianciotto, N. et al. "DNA sequence homology between att B-related sites of <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , <i>Corynebacterium ulcerans</i> , <i>Corynebacterium glutamicum</i> , and the attP site of lambda corynephage," <i>FEMS Microbiol. Lett.</i> , 66:299-302 (1990)
X54740	argS; lysA	Arginyl-tRNA-synthetase; Diaminopimelat-decarboxylase	Marcel, T. et al. "Nucleotide sequence and organization of the upstream region of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> lysA gene," <i>Mol. Microbiol.</i> , 4(11):1819-1830 (1990)
X55994	trpL; trpE	mutmaßliches Leader-Peptid; Anthranilate synthase-Komponente 1	Heery, D.M. et al. "Nucleotide sequence of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> trpE gene," <i>Nucleic Acids Res.</i> , 18(23):7133 (1990)
X56037	thrC	Threonine synthase	Han, K.S. et al. "The molecular structure of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> threonine synthase gene," <i>Mol. Microbiol.</i> , 4(10):1693-1702 (1990)
X56075	attB-verwandte Stelle	Bindungsstelle	Cianciotto, N. et al. "DNA sequence homology between att B-related sites of <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , <i>Corynebacterium ulcerans</i> , <i>Corynebacterium glutamicum</i> , and the attP site of lambda corynephage," <i>FEMS Microbiol. Lett.</i> , 66:299-302 (1990)
X57226	lysC-alpha; lysC-beta; asd	Aspartokinase-alpha-Untereinheit; Aspartokinase-beta-Untereinheit; Aspartal-beta-semialdehyde-dehydrogenase	Kalinowski, J. et al. "Genetic and biochemical analysis of the Aspartokinase from <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>Mol. Microbiol.</i> , 5(5):1197-1204 (1991); Kalinowski, J. et al. "Aspartokinase genes lysC alpha and lysC beta overlap and are adjacent to the aspartate beta-semialdehyde dehydrogenase gene asd in <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>Mol. Gen. Genet.</i> , 224(3):317-324 (1990)
X59403	gap; pgk; ipi	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Triosephosphate-isomerase	Eikmanns, B.J. "Identification, sequence analysis, and expression of a <i>Corynebacterium glutamicum</i> gene cluster encoding the three glycolytic enzymes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 3-phosphoglycerate kinase, and triosephosphate isomerase," <i>J. Bacteriol.</i> , 174(19):6076-6086 (1992)
X59404	gdh	Glutamate dehydrogenase	Bormann, E.R. et al. "Molecular analysis of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> gdh gene encoding glutamate dehydrogenase," <i>Mol. Microbiol.</i> , 6(3):317-326 (1992)
X60312	lysI	L-Lysinpermease	Seep-Feldhaus, A.H. et al. "Molecular analysis of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> lysI gene involved in lysine uptake," <i>Mol. Microbiol.</i> , 5(12):2995-3005 (1991)

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
X66078	cop1	Ps1 protein	Joliff, G. et al. "Cloning and nucleotide sequence of the csp1 gene encoding PS1, one of the two major secreted proteins of <i>Corynebacterium glutamicum</i> : The deduced N-terminal region of PS1 is similar to the Mycobacterium antigen 85 complex," <i>Mol. Microbiol.</i> , 6(16):2349-2362 (1992)
X66112	glt	Citrate synthase	Eikmanns, B.J. et al. "Cloning sequence, expression and transcriptional analysis of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> gltA gene encoding citrate synthase," <i>Microbiol.</i> , 140:1817-1828 (1994)
X67737	dapB	Dihydriodipicolinate reductase	Peyret, J.L. et al. "Characterization of the cspB gene encoding PS2, an ordered surface-layer protein in <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>Mol. Microbiol.</i> , 9(1):97-109 (1993)
X69103	csp2	Oberflächenprotein PS2	Bonamy, C. et al. "Identification of IS1206, a <i>Corynebacterium glutamicum</i> IS3-related insertion sequence and phylogenetic analysis," <i>Mol. Microbiol.</i> , 14(3):571-581 (1994)
X69104		IS3 -verwandtes Insertionselement	Patek, M. et al. "L-leucine synthesis in <i>Corynebacterium glutamicum</i> : enzyme activities, structure of leuA, and effect of leuA inactivation on lysine synthesis," <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> , 60(1):133-140 (1994)
X70959	leuA	Isopropylmalat synthase	Eikmanns, B.J. et al. "Cloning sequence analysis, expression, and inactivation of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> icd gene encoding isocitrate dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme," <i>J. Bacteriol.</i> , 177(3):774-782 (1995)
X71489	icd	Isocitrate dehydrogenase (NADP+)	
X72855	GDHA	Glutamate dehydrogenase (NADP+)	Heery, D.M. et al. "A sequence from a tryptophan-hyperproducing strain of <i>Corynebacterium glutamicum</i> encoding resistance to 5-methyltryptophan," <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 201(3):1255-1262 (1994)
X75083, X70584	mttA	5-Methyltryptophanresistenz	Fitzpatrick, R. et al. "Construction and characterization of recA mutant strains of <i>Corynebacterium glutamicum</i> and <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ," <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> , 42(4):575-580 (1994)
X75085	recA		

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
X75504	aceA; thiX	partielle Isocitratlyase; ?	Reinschmidt, D.J. et al. "Characterization of the isocitrate lyase gene from <i>Corynebacterium glutamicum</i> and biochemical analysis of the enzyme," <i>J. Bacteriol.</i> , 176(12):3474-3483 (1994)
X76875		ATPase beta-Untereinheit	Ludwig, W. et al. "Phylogenetic relationships of bacteria based on comparative sequence analysis of elongation factor Tu and ATP synthase beta-subunit genes," <i>Antonie Van Leeuwenhoek</i> , 64:285-305 (1993)
X77034	tuf	Elongationsfaktor Tu	Ludwig, W. et al. "Phylogenetic relationships of bacteria based on comparative sequence analysis of elongation factor Tu and ATP synthase beta-subunit genes," <i>Antonie Van Leeuwenhoek</i> , 64:285-305 (1993)
X77384	recA		Billman-Jacobe, H. "Nucleotide sequence of a recA gene from <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>DNA Seq.</i> , 4(6):403-404 (1994)
X78491	aceB	Malat synthase	Reinschmidt, D.J. et al. "Malate synthase from <i>Corynebacterium glutamicum</i> pta-ack operon encoding phosphotransacetylase: sequence analysis," <i>Microbiology</i> , 140:3099-3108 (1994)
X80629	16S rDNA	16S ribosomale RNA	Rainey, F.A. et al. "Phylogenetic analysis of the genera <i>Rhodococcus</i> and <i>Norcardia</i> and evidence for the evolutionary origin of the genus <i>Norcardia</i> from within the radiation of <i>Rhodococcus</i> species," <i>Microbiol.</i> , 141:523-528 (1995)
X81191	gluA; gluB; gluC; gluD	Glutamat-Aufnahmesystem	Kroneneyer, W. et al. "Structure of the gluABCD cluster encoding the glutamate uptake system of <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>J. Bacteriol.</i> , 177(5):1152-1158 (1995)
X81379	dapE	Succinyldiaminopimelatidesuccinylase	Wehrmann, A. et al. "Analysis of different DNA fragments of <i>Corynebacterium glutamicum</i> complementing dapE of <i>Escherichia coli</i> ," <i>Microbiology</i> , 40:3349-56 (1994)
X82061	16S rDNA	16S ribosomale RNA	Ruijny, R. et al. "Phylogeny of the genus <i>Corynebacterium</i> deduced from analyses of small-subunit ribosomal DNA sequences," <i>Int. J. Syst. Bacteriol.</i> , 45(4):740-746 (1995)
X82928	asd; lysC	Aspartate semialdehyde dehydrogenase; ?	Serebrjiski, I. et al. "Multicopy suppression by asd gene and osmotic stress-dependent complementation by heterologous proA in proA mutants," <i>J. Bacteriol.</i> , 177(24):7255-7260 (1995)

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Naime	Genfunktion	Literaturstellen
X82929	proA	Gamma-glutamylphosphatreduktase	Serebrijski, I. et al. "Multicopy suppression by <i>asd</i> gene and osmotic stress-dependent complementation by heterologous <i>proA</i> in <i>proA</i> mutants," <i>J. Bacteriol.</i> 177(24):7255-7260 (1995)
X84257	16S rDNA	16S ribosomale RNA	Pascual, C. et al. "Phylogenetic analysis of the genus <i>Corynebacterium</i> based on 16S rRNA gene sequences," <i>Int. J. Syst. Bacteriol.</i> 45(4):724-728 (1995)
X85965	aroP; dapE	aromatische Aminosäurepermease; ?	Wehrmann, A. et al. "Functional analysis of sequences adjacent to dapE of <i>Corynebacterium glutamicum</i> proline reveals the presence of <i>aroP</i> , which encodes the aromatic amino acid transporter," <i>J. Bacteriol.</i> 177(20):5991-5993 (1995)
X86157	argB; argC; argD; argF; argJ	Acetylglutamatkinase; N-acetyl- gamma-glutamyl-phosphatreduktase; Acetyl- ornithinaminotransferase; Ornithin- carbamoyltransferase; Glutamat-N-acetyl- transferase	Sakanyan, V. et al. "Genes and enzymes of the acetyl cycle of arginine bio- synthesis in <i>Corynebacterium glutamicum</i> : enzyme evolution in the early steps of the arginine pathway," <i>Microbiology</i> 142:99-108 (1996)
X89084	pta; ackA	Phosphatacetyltransferase; Acetokinase	Reinschid, D.J. et al. "Cloning, sequence analysis, expression and inactivation of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> pta-ack operon encoding phosphotransacetylase and acetate kinase," <i>Microbiology</i> 145:503-513 (1999)
X89850	attB	Bindungsstelle	Le Marrec, C. et al. "Genetic characterization of site-specific integration functions of phi AAU2 infecting "Arthrobacter aureus" C70," <i>J. Bacteriol.</i> 178(7):1996-2004 (1996)
X90356		Promotorfragment F1	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> 142:1297-1309 (1996)
X90357		Promotorfragment F2	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> 142:1297-1309 (1996)
X90358		Promotorfragment F10	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> 142:1297-1309 (1996)

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
X90359	Promotorfragment F13	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)
X90360	Promotorfragment F22	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)
X90361	Promotorfragment F34	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)
X90362	Promotorfragment F37	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)
X90363	Promotorfragment F45	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)
X90364	Promotorfragment F64	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)
X90365	Promotorfragment F75	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)
X90366	Promotorfragment PF101	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)
X90367	Promotorfragment PF104	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)
X90368	Promotorfragment PF109		

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
X93513	amt	Ammonium-Transportsystem	Stiewe, R.M. et al. "Functional and genetic characterization of the (methyl) ammonium uptake carrier of <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>J. Biol. Chem.</i> , 271(10):5398-5403 (1996)
X93514	hetP	Glycin-Betain-Transportsystem	Peter, H. et al. "Isolation, characterization, and expression of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> hetP gene, encoding the transport system for the compatible solute glycine betaine," <i>J. Bacteriol.</i> , 178(17):5229-5234 (1996)
X95649	orf4		Patek, M. et al. "Identification and transcriptional analysis of the dapB-ORF2-dapA-ORF4 operon of <i>Corynebacterium glutamicum</i> , encoding two enzymes involved in L-lysine synthesis," <i>Biotechnol. Lett.</i> , 19:1113-1117 (1997)
X96471	lysE; lysG	Lysinexporterprotein; Lysinexportregulatorprotein	Vrijic, M. et al. "A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>Mol. Microbiol.</i> , 22(5):815-826 (1996)
X96580	panB; panC; xylB	3-Methyl-2-oxobutanoatehydroxymethyltransferase; Pantoat-beta-alaminigase; Xylulokinase	Sahn, H. et al. "D-pantothenate synthesis in <i>Corynebacterium glutamicum</i> and use of panBC and genes encoding L-valine synthesis for D-pantothenate overproduction," <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> , 65(5):1973-1979 (1999)
X96962		Insertionssequenz IS1207 und Transposase	Ramos, A. et al. "Cloning, sequencing and expression of the gene encoding elongation factor P in the amino-acid producer <i>Brevibacterium lactofermentum</i> (<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13869)," <i>Gene</i> , 198:217-222 (1997)
X99289		Elongationsfaktor P	Mateos, L.M. et al. "Nucleotide sequence of the homoserine kinase (thrB) gene of the <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ," <i>Nucleic Acids Res.</i> , 15(9):3922 (1987)
Y00140	thrB	Homoserinkinase	Ishino, S. et al. "Nucleotide sequence of the meso-diaminopimelate D-dehydrogenase gene from <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>Nucleic Acids Res.</i> , 15(9):3917 (1987)
Y00151	ddh	Meso-diaminopimelat-D-dehydrogenase (EC 1.4.1.16)	Mateos, L.M. et al. "Nucleotide sequence of the homoserine dehydrogenase (thmA) gene of the <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ," <i>Nucleic Acids Res.</i> , 15(24):10598 (1987)
Y00476	thrA	Homoserindehydrogenase	

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
Y00546	hom; thrB	Homoserindihydrogenase; Homoserin-kinase	Peoples, O.P. et al. "Nucleotide sequence and fine structural analysis of the Corynebacterium glutamicum hom-thrB operon," <i>Mol. Microbiol.</i> , 2(1):63-72 (1988)
Y08964	murC; ftsQ/divD; ftsZ	UDP-N-Acetylglucosaminyltransferase; Teilungsinitaliationsprotein oder Zellteilungsprotein; Zellteilungsprotein	Honrubia, M.P. et al. "Identification, characterization, and chromosomal organization of the ftsZ gene from <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ," <i>Mol. Gen. Genet.</i> , 259(1):97-104 (1998)
Y09163	putP	High affinity-Prolintransportsystem	Peter, H. et al. "Isolation of the putP gene of <i>Corynebacterium glutamicum</i> proline and characterization of a low-affinity uptake system for compatible solutes," <i>Arch. Microbiol.</i> , 168(2):143-151 (1997)
Y09548	pyc	Pyruvatecarboxylase	Peters-Wendisch, P.G. et al. "Pyruvate carboxylase from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : characterization, expression and inactivation of the pyc gene," <i>Microbiology</i> , 144:915-927 (1998)
Y09578	leuB	3-Isopropylmalatehydrogenase	Patek, M. et al. "Analysis of the leuB gene from <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> , 50(1):42-47 (1998)
Y12472		Bindungsstelle Bacteriophage Phi-16	Moreau, S. et al. "Site-specific integration of corynephage Phi-16: The construction of an integration vector," <i>Microbiol.</i> , 145:539-548 (1999)
Y12537	proP	Prolin/Ectoin-Aufnahmestystemprotein	Peter, H. et al. "Corynebacterium glutamicum is equipped with four secondary carriers for compatible solutes: Identification, sequencing, and characterization of the proline/ectoine uptake system, ProP, and the ectoine/proline/glycine betaine carrier, EctP," <i>J. Bacteriol.</i> , 180(22):6005-6012 (1998)
Y13221	glnA	Glutamin synthetase I	Jakoby, M. et al. "Isolation of <i>Corynebacterium glutamicum</i> glnA gene encoding glutamine synthetase I," <i>FEMS Microbiol. Lett.</i> , 154(1):81-88 (1997)
Y16642	lpd	Dihydropiophoriniddihydrogenase	
Y18039		Bindungsstelle Corynephage 304L	Moreau, S. et al. "Analysis of the integration functions of φ304L: An integrase module among corynephages," <i>Virology</i> , 255(1):150-159 (1999)
221501	argS; lysA	Arginy]-tRNA-Synthetase; Diaminopimelatecarboxylase (partiell)	Oguiza, J.A. et al. "A gene encoding arginy]-tRNA Synthetase is located in the upstream region of the lysA gene in <i>Brevibacterium lactofermentum</i> : Regulation of argS-lysA cluster expression by arginine," <i>J. Bacteriol.</i> , 175(22):7356-7362 (1993)

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
Z21502	dapA; dapB	Dihydrodipicolinate synthase; Dihydrodipicolinate reductase, and a third polypeptide of unknown function	Pisabarro, A. et al. "A cluster of three genes (dapA, orf2, and dapB) of <i>Brevibacterium laevigatum</i> encodes dihydronicotinate reductase, and a third polypeptide of unknown function," <i>J. Bacteriol.</i> , 175(9):2743-2749 (1993)
Z29563	thrC	Threonine synthase	Malumbres, M. et al. "Analysis and expression of the thrC gene of the encoded threonine synthase," <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> , 60(7):2209-2219 (1994)
Z46753	16S rDNA	Gene für 16S ribosomale RNA	Oguiza, J.A. et al "Multiple sigma factor genes in <i>Brevibacterium lactofermentum</i> : Characterization of sigA and sigB," <i>J. Bacteriol.</i> , 178(2):550-553 (1996)
Z49822	sigA	SigA-Sigmafaktor	Oguiza, J.A. et al "The galE gene encoding the UDP-galactose 4-epimerase of <i>Brevibacterium lactofermentum</i> is coupled transcriptionally to the dndR gene," <i>Gene</i> , 177:103-107 (1996)
Z49823	galE; dtxR	Katalytische Aktivität UDP-Galactose 4-epimerase; Diphtheretoxin-regulatorisches Protein	Oguiza, J.A. et al "Multiple sigma factor genes in <i>Brevibacterium lactofermentum</i> : Characterization of sigA and sigB," <i>J. Bacteriol.</i> , 178(2):550-553 (1996)
Z49824	orf1; sigB	?; SigB-Sigmafaktor	Correia, A. et al. "Cloning and characterization of an IS-like element present in the genome of <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ATCC 13869," <i>Gene</i> , 170(1):91-94 (1996)
Z66534		Transposase ?	

- 1) Eine Sequenz für dieses Gen wurde in den angegebenen Literaturstellen veröffentlicht. Die von den Erfindern der vorliegenden Erfindung erhaltene Sequenz ist jedoch erheblich länger als die veröffentlichte Version. Man nimmt an, daß die veröffentlichte Version auf einem inkorrekten Startcodon beruht und somit nur ein Fragment des tatsächlichen codierenden Bereichs darstellt.

TABELLE 3: Corynebacterium- und Brevibacterium-Stämme, die sich in der erfundungsgemäßen Praxis einsetzen lassen.

Gattung	Art	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
Brevibacterium	ammoniagenes	21054							
Brevibacterium	ammoniagenes	19350							
Brevibacterium	ammoniagenes	19351							
Brevibacterium	ammoniagenes	19352							
Brevibacterium	ammoniagenes	19353							
Brevibacterium	ammoniagenes	19354							
Brevibacterium	ammoniagenes	19355							
Brevibacterium	ammoniagenes	19356							
Brevibacterium	ammoniagenes	21055							
Brevibacterium	ammoniagenes	21077							
Brevibacterium	ammoniagenes	21553							
Brevibacterium	ammoniagenes	21580							
Brevibacterium	ammoniagenes	39101							
Brevibacterium	butanicum	21196							
Brevibacterium	divaricatum	21792	P928						
Brevibacterium	flavum	21474							
Brevibacterium	flavum	21129							
Brevibacterium	flavum	21518							
Brevibacterium	flavum				B11474				
Brevibacterium	flavum				B11472				
Brevibacterium	flavum			21127					
Brevibacterium	flavum			21128					
Brevibacterium	flavum			21427					
Brevibacterium	flavum			21475					
Brevibacterium	flavum			21517					
Brevibacterium	flavum			21528					
Brevibacterium	flavum			21529					

Gattung	Art	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
<i>Brevibacterium</i>	flavum			BI1477					
<i>Brevibacterium</i>	flavum			BI1478					
<i>Brevibacterium</i>	flavum	21127							
<i>Brevibacterium</i>	healli	15527							
<i>Brevibacterium</i>	ketoglutamicum	21004							
<i>Brevibacterium</i>	ketoglutamicum	21089							
<i>Brevibacterium</i>	ketosoreducum	21914							
<i>Brevibacterium</i>	lactofermentum			70					
<i>Brevibacterium</i>	lactofermentum			74					
<i>Brevibacterium</i>	lactofermentum			77					
<i>Brevibacterium</i>	lactofermentum	21798							
<i>Brevibacterium</i>	lactofermentum	21799							
<i>Brevibacterium</i>	lactofermentum	21800							
<i>Brevibacterium</i>	lactofermentum	21801							
<i>Brevibacterium</i>	lactofermentum			BI1470					
<i>Brevibacterium</i>	lactofermentum			BI1471					
<i>Brevibacterium</i>	lactofermentum	21086							
<i>Brevibacterium</i>	lactofermentum	21420							
<i>Brevibacterium</i>	lactofermentum	21086							
<i>Brevibacterium</i>	lactofermentum	31269							
<i>Brevibacterium</i>	linens	9174							
<i>Brevibacterium</i>	linens	19391							
<i>Brevibacterium</i>	linens	8377							
<i>Brevibacterium</i>	paraffinolyticum			11160					
<i>Brevibacterium</i>	spcc.				717.73				
<i>Brevibacterium</i>	spcc.					717.73			
<i>Brevibacterium</i>	spec.			14604					
<i>Brevibacterium</i>	spec.			21860					
<i>Brevibacterium</i>	spec.			21864					

Gattung	Art	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
<i>Brevibacterium</i>	spec.	21865							
<i>Brevibacterium</i>	spec.	21866							
<i>Brevibacterium</i>	spec.	19240							
<i>Corynebacterium</i>	<i>acetoacidophilum</i>	21476							
<i>Corynebacterium</i>	<i>acetoacidophilum</i>	13870							
<i>Corynebacterium</i>	<i>acetoglutamicum</i>								
<i>Corynebacterium</i>	<i>acetoglutamicum</i>								
<i>Corynebacterium</i>	<i>acetoglutamicum</i>								
<i>Corynebacterium</i>	<i>acetoglutamicum</i>								
<i>Corynebacterium</i>	<i>acetoglutamicum</i>								
<i>Corynebacterium</i>	<i>acetoglutamicum</i>								
<i>Corynebacterium</i>	<i>acetoglutamicum</i>								
<i>Corynebacterium</i>	<i>acetoglutamicum</i>								
<i>Corynebacterium</i>	<i>acetoglutamicum</i>								
<i>Corynebacterium</i>	<i>acetophilum</i>								
<i>Corynebacterium</i>	<i>ammoniagenes</i>	6872							
<i>Corynebacterium</i>	<i>ammoniagenes</i>	15311							
<i>Corynebacterium</i>	<i>fujikense</i>	21496							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	14067							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	39137							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21254							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21255							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	31830							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	13032							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	14305							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	15455							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	13058							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	13059							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	13060							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21492							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21513							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21526							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21543							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	13287							

Gattung	Art	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21851							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21253							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21514							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21516							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21299							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21300							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	39684							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21488							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21649							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21650							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	19223							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	13869							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21157							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21158							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21159							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21355							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	31808							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21674							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21562							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21563							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21564							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21565							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21566							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21567							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21568							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21569							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21570							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21571							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21572							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21573							

Gattung	Art	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21579							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	19049							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	19050							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	19051							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	19052							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	19053							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	19054							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	19055							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	19056							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	19057							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	19058							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	19059							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	19060							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	19185							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	13286							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21515							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21527							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21544							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21492							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>			B8183					
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>			B8182					
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>			B12416					
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>			B12417					
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>			B12418					
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>			B11476					
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21608							
<i>Corynebacterium</i>	<i>lilium</i>			P973					
<i>Corynebacterium</i>	<i>nitrophilus</i>	21419							
<i>Corynebacterium</i>	spec.			P4445					
<i>Corynebacterium</i>	spec.			P4446					

Gattung	Art	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
<i>Corynebacterium</i> spec.		31088							
<i>Corynebacterium</i> spec.		31089							
<i>Corynebacterium</i> spec.		31090							
<i>Corynebacterium</i> spec.		31090							
<i>Corynebacterium</i> spec.		31090							
<i>Corynebacterium</i> spec.		15954							20145
<i>Corynebacterium</i> spec.		21857							
<i>Corynebacterium</i> spec.		21862							
<i>Corynebacterium</i> spec.		21863							

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA
 FERM: Fermentation Research Institute, Chiba, Japan
 NRRL: Northern Regional Research Laboratory, Peoria, IL, USA
 CECT: Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, Spain
 NCIMB: National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd., Aberdeen, UK
 CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, NL
 NCTC: National Collection of Type Cultures, London, UK
 DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany

Siehe Sugawara, H. et al. (1993) World directory of collections of cultures of microorganisms:
 Bacteria, fungi and yeasts (4. Aufl.), World federation for culture collections world data center on
 microorganisms, Saimata, Japen.

RXN03082 translatiert von RXN03082 (9827) von 1 bis 321
MVPESAMLTGLIREAGGTPVVDLSGAVGTITADPEQVVAMAPEIIIIQDFQGKGRENFANFLSNPALANVPAIENDKIFYAD
TVTTGVTAGTDITGLQQVAEMLS

RXN03082 - 5'-Region
CAGAAGCAATCGCAGAAATCGATGCAAACCGCATTGACATTGACAAGCCTGCCACCTCCCCACTGTGCTCAGTTGATGC
AACCGCGGACCACGCCAA

RXN03082 - kodierende Region
ATGGTCATGCCAGAATCTGCCATGCTCACCGGCCCTGATCCCGCGAAGCCGGCGGCACTCCAGTGGTAGATTCTCTCGGCGCGGT
AGGCACCATCACTGCAGACCCAGAACAGTTGTTGCGATGGCACCTGAGATCATCATCATTAGGACTCCAAGGTAAAGGCC
GAGAGAACCTCGCTAATTCTCTCCAACCCAGCGCTAGCCAAACGTTCCCGCCATTGAAAACGACAAGATTTCTACGCCGAC
ACTGTCACCACTGGAGTTACTGCAGGTACCGATATCACCACGGTCTGCAGCAAGTGGCAGAAATGCTGAGC

RXN03082 - 3'-Region
TAGTTTGAGATGTTGAAACTAG

RXN03081 translatiert von RXN03081 (3848) von 1 bis 459
MKKSLIAIVASALVLSGCTSDDSSGTSGTVETTSITTSVAAADGAFPRTVTLDDSSITLESKPERIAVLPEAASLVLPI
GADRVVMTAEMDTADEETAALASQVEYQVKNGGRLDPEQVVAQDPDLVIVSARFDTEQGTIDILEGLNP

RXN03081 - 5'-Region
ACGGACTGCCATTGCGGTGCGCGATGATCCGAAACCAGCTCACTTCGGGTGATCCCGATCCAAATCCCTTGATTGAAA
GTTTGACTAAAAACCC

RXN03081 - kodierende Region
ATGAAAAAAATCACTCATGCCATTGTTGCCAGTGCCTCGTTAACGCGCTGCACCTCTGATTCTCTGACTCTCCGGCAC
TTCCGGAACGTGAAACCACCTCGATTACAACCAGCGTTGCCGCAGCTGACGGCGCATTCACGCACCGTCACACTCGACG
ATTCCTCCATCACCTAGAACCAACCAGAGCGCATGCCGTACTCACCCCCAGAGGCAGCATTGGTTCTCCCCATCACA
GGCGCCGACCGCGTCGTGATGACCGCCGAAATGGACACCGCTGACGAAGAAACCGCAGCTCTGGCCTCCAAAGTGGAAATACCA
AGTCAAAAACGGTGGCAGGCTCGACCCCCAACAGTTGTCGCCGGCGACCCAGATTGGTATCGTCAGTGCCGTTTCGATA
CCGAACAAGGCACCATCGACATTGGAAAGGCCTAACGTCCG

RXN03081 - 3'-Region
TAGTTAACCTCGATTCAAGACGCT

RXN03080 translatiert von RXN03080 (3725) von 1 bis 780
MPQLVEIRDLNVEFPSRHAVKNVSFSAPAGKVTALIGPNGAGKSTALSAIAGLVESTGEVMVGGSGVASKSAKARARLLSLVP
QNTELRIGFSARDVVAMGRYPHRGRFAVETDADRRATDDALRAINALDIAEQPVNELSGQQQLIHIGRALAQDTAVVLLDEP
VSALDLRHQVEVLQLLRARANGTTIVVLHDLNHVARWCDHAVL MADGEVVSQGDIREVLEPATLSTVYGLPIAVRDDPETS
SLRVIPHPNPF

RXN03080 - 5'-Region

CTTGCAAAACAGGCCTGGTGGCGTTCACCAATTTCCTTATTTACTGCTCAGCATGCGCAAGCGACGCCGAT
TGGGGCTGTAAAAACTC

RXN03080 - kodierende Region

ATGCCCTCAATTAGTTGAAATTCTGTATCTCAACGTTGAATTCCCTCTCGCCATGCGAGTGAACAAAGCTGTCTTTCTGCACC
TGCTGGAAAAGTCACCGCACTGATTGCCCAAATGGTGTGGTAAAAGTACTGCCCTTCGGCGATTGCGAGGATTGGTTGAAT
CCACCGCGAGGTAATGGTGGGGAGTGGGTGCGTCGAAAGCGCTAAAGCCCAGCCCGCTGCTCATCGTGCCTCGCCG
CAAACACCGAGTTGCGCATTGGTTAGTGCACCGCAGCTGCGCCTGCGCCATCAACCGCTCGACATCGCCGAGCAGCCGTCAACG
GGAGACCGACGAGATCGACGCCAACCGATGACGCCCTGCGCCATCAACCGCTCGACATCGCCGAGCAGCCGTCAACG
AATTATCGGGCGGCCAGCAGCAGCTCATCCACATCGGCCAGCGCTCGCCAAGACACCGCGTCGTGCTCTCGACGAGCCC
GTCTCCGCCCTGATCTACGGCACCAAGTTGAAGTCCTCAACTCCTGCGCCCGAGCTAATTCCGGCACCCACCGTATCGT
CGTCCTCACGATCTCAACCACGTTGCCCGTTGGTGCACCATGCAGTGTGATGGCCGACGGCAAGTTGTCTCCAAGGTG
CATCCCGAGGTGCTCGAACCTGCCACACTGTCCACCGTGTACGGACTGCCATTGCGGTGCGCGATGATCCCGAAACCAGC
CACTTCGCGTGTACCGCATCCAAATCCCTT

RXN03080 - 3'-Region

TGATTGAAAGTTGACTAAAAAA

27.08.80

9

RXN01732 translatiert von RXN01732 (6268) von 1 bis 1050
MFKLSKPSKSMRVAVSTLAISTLALVGSSSSDESSSSSASSSDAASQWPESITSLVPSTEGEDLAEALAPLTDYLS
IEVNGVVASDYAATVEALGADQAQVIITDAGSLYNAIEQYDAQLILRDVRFGATSYSAVAYTNNPDKYCDDAPVAASYAASDV
DMLYCNGIETEGQAATGEGPAALDALEKIESGDKVALQAATSPAGYQYPIVAMQDLMGMDTDSAFVQVPVEGNNAVLSVLNGD
AEVSFGFWNDARSTVLSEAPNAEAEDVVAFAYTEMIPNGGVAASKSLPSDVLVEKLTELMDDYADSSEEAKDVMFDMVGLSDWTAD
TAQDEITRYGEILKKFSN

RXN01732 - 5'-Region
GATTCTATCGCTGATCTCCCTCTCCTGCCTGGTTGTTCCCGGGTCTCCTCTTAACTTCTTGTCTCATGTCGCTGAA
AGGTTTTAAAGATCTC

RXN01732 - kodierende Region
ATGTTCAAGCTCTAAGCCATCCAAGTCCATGCGTGTGTTCTACGCTTGCATCTACCCCTGCTCTAGTTGGTTG
TTCCCTCTCCGATGAGTCTTCTTCATCATCTCGCTCTTCTCGGATGCTGCAAGCCAGTGGCCTGAGTCCTACTT
TGTCTCTTGTCTTACTGAGGGTGAGGATTGGCTGAAGCGTTGGCTCCTTGACTGATTACCTGCTGAGAACCTGGT
ATTGAGGTCAATGGTGTGGTGGCGTCTGATTACGCTGCAACCGTTGAGGTTGGGTGCTGATCAGGCTCAGGTGATCATCAC
TGATGCGGGTCCCTGTATAACGCGATTGAGCAGTACGATGCGCAGTGTGATTCTGCGTGTGCGTTGCGTTCGGTGC
ACTCTGCTGTGGCGTACACCAACATCTGATAAGTACTGCGACGATGCCAGTGGCTGCGCTTATGCTGCGTCCGATGTA
GACATGCTTACTGCAACGGTATTGAAACTGAGGCCAGGCTGCTACCGGTGAGGCCAGCAGCTCTGATGCGCTGGAAA
GTCGAGTCCGGTACAAGGTAGCGCTGCAACCTCTCCTGCGGGTACCAAGTACCCCTATCGTCGCTATGCGAGGATC
GGCATGGATACCGATTCCGTTTGTTCAGGTCCAGTAGAGGGCAACAACAGCTGTGCTGTGCTGCTGAACGGTGAC
GGGAAGTGTCTCGGTTCTGGGATGCGCTCCACCGTGTGCTGAGGCTCTAACGAGCTGAGGATGTCGTAGCGTT
TGCCTACACCGAGATGATCCCTAACGGTGGCGTCCAGCGTCCAAGTCCCTCCATCGACCTGGTGGAAAAGCTCACCGAGT
TGATGGATGATTACGAGATTCCCTCGAGGAAGCCAAGGATGTCATGTTGACATGGTTGGTCTATCTGACTGGACTGCTGAT
ACCGCACAGGATGAAATCACTCGTTACGGCGAGATCCTGAAGAAGTTCTCCAAC

RXN01732 - 3'-Region
TAATTCCTGTTCCAATACTC

RXN01000 translatiert von RXN01000 (4854) von 1 bis 846

MSTLTSHRTVPAPSSPPARPNKLARNIVAIVAAALIVLIATGTLKIEWNELPQMPAQVWHYLELMFSDPDWSKFGRAVQEMWRS
IAMAWLGAILCVVSVPLGMLAARGVGPYWLRTVLRVFAVIRAFPEVVIALLTGTGLTPFTGALALGIGIGQQAKWTYE
AIESTPTGPSEAVRAAGGTTPEVLRWALWPQVAPSIASFALYRFEINIRTSAVLGIVGAGGIGSMLANYTNYRQWDTVGMLLI
VVVATMIVDLISGTIRRIMKGASDRVVAPSN

RXN01000 - 5'-Region

CTTTCTATGCCTACCGGGATGTTCCGTGATCATTCTGAAATCCTCATCGTGGTATTGTCATTGAAGTAATCTCCAACGCA
CTTCGAAAGAGGCTGGT

RXN01000 - kodierende Region

ATGAGCACCTAACCTCTCACCGCACAGTACCGGCCCCAGCTCTCCCCGGCGCCCAACAAACTGGCGCGCAATATCGT
TGCAATTGTCGCTCGCTGATTGCTTATAGCTACCGGCACGCTCAAGATCGAGTGAATGAGCTTCCGAGATGCCGCGC
AGGTGTGGCATTACTTAGAGCTGATGTTAGCGATCCCGATTGGTCGAAGTTGCCGCGCCGTCCAGGAATGTGGCCTTC
ATGCCATGGCGTGGTGGTGCCATTATGCGTGGTCTCTGCCCTCTGGAATGTTGGCTGCCGCGGGTGGGACC
TTATTGGCTGCGTACCGTTTACGGTTCGTGTTCGCGGTGATTGCGTGGTCTCCGAAGTGGTATCGCAATTATTTGCTAA
CTGTCACC GGCTAACCTCTTACTGGTGCCTCGCATTGGGTATCTCCGGTATGGACAAACAGGCAAAGTGGACCTATGAA
GCCATTGAGTCCACTCCCACCGGCCGTCAAGAGGCAGTGGTGCAGCGGGTGAAGTACGCCGGAGGTTCTGCGGTGGCGTT
GTGGCCACAGGTTGCGCCATCCATTGCATCTTGCCCTGACCGCTTGAGATCAACATCCGTACCTCTGCGGTATTGGGCA
CTTGGTGCAGGTTGATCGGTAGTATGCTTCCAATTACACCAACTACAGGCAAGTGGACACCGTGGCATGCTGCTCATC
CGTGGTTGTCGAACGATGATCGTCACTCATCTCCGGCACCATCCGCCCGCATCATGAAGGGGCTAGTGACCGTGT
CGTGGCACCAAGCAAC

RXN01000 - 3'-Region

TGACGCTCCACCAAGCATCCGCA

RXN01002 translatiert von RXN01002 (1757) von 1 bis 804

MNSDASATTNSWAINFDHVS VTY PNTKALDDVSLTINPGEMVAIVGLSGSGKSTLIRTINGLVRATEGVTVGPHQINTLKG
KALRDARGQIGMIFQGFNL SERSSVQNVLVGRFAHTAWWRNLLGFPTEHDKQIAFHALESVGLHVKWTRAGALSGGQKQRV
AIARALSQDPSVMLADEPVASLDPPTAHSMRDLENINNVEGLTVLVLNLHIDLARQYTTLVGLRAGKLVYDGPISEATDKD
FEAIYGRPIQAKDLLGDRA

RXN01002 - 5'-Region

GACTGCTGATACCGCACAGGATGAAATCACTCGTTACGGCAGATCCTGAAGAAGTTCTCCA ACTAATTCCCTGTTCCAAT
ACTCAAGGTGTGCGCAT

RXN01002 - kodierende Region

ATGAATTCTGATGCTTCGGCTACCACCAACTCCTGGCTATCAACTTCGACCATGTGTCGGTGACGTATCCAATGGGACGAA
AGCCCTCGATGATGTTCCCTCACCATCAATCCCGGTGAGATGGTTGCCATGTGGGTCTGTCAGGATCGGTAAATCCACGC
TGATTCGCACGATCAACGGCTTGTCCCGCTACCGAAGGCACCGTGACGGTGGGCCATCGTGGGTCTGTCAGGATCGGTAAATCCACGC
AAAGCACTGCGTGATGCCGTGGGCAGATCGGCATGATTTCCAGGGGTTCAACCTGTCGGAACGCAGCAGTGTGTTCCAGAA
TGTGTTGGTGGGCCGCTCGCGCACACAGCGTGGTGGCGTAACCTCCTCGGGTTTCCCACGGAGCAGCAGAAGCAGATTGCTT
TTCACGCCTTGGAGTCCGTGGCATTTCACAAAGTGTGGACCCGAGCTGGTGTGCTTGACAGAAACAGCGCGTT
GCTATTGCGCGCGCTTATCGCAAGATCCGTCTGTCATGCTGGCAGATGAGCCTGTGGCAAGCCTTGATCCGCCAACCGCGCA
TTCCGTGATGCGCGATCTAGAAAACATCAACACGTGGAAGGCCTCACCGTGTGGTGAACTTGACTTGATTGATTGGCTC
CAATACACCACAAGGCTTGTGGTTGCGTGCCGGCAAGCTGGTCTATGACGGCCTATCTGAGGCCACCGATAAAAGAC
TGAAGCTATCTATGGTCGCCCCATCCAGGCTAAAGACCTGCTAGGTGATCGCGCA

RXN01002 - 3'-Region

TGACCACGCCCTCTTACACTT

91

RXN02074 translatiert von RXN02074 (7807) von 1 bis 1623
MRSLLRDIPAVGWLITATIVRTLVALVIGILLIDVPSPAHSAMLWWVLAGATAAAALLCAEAVLPQRIRARVERSWRRQ
LAAKNLENSSSSSDAQLITLATEATSKASTYTVMFLGPYFAVFLAPLTIVAVVGAISWPPIAGILCLGLCVIPFVISWAQRM
LKGAGAGYGRASGQLAGVFLESVRTLGGTMMMLNAAGQRRQIITQRAENMRSQVMSLLYRNQMLILVTDGVFGVATTMVAAVFA
IGGFFSGSLTLGQAVALVLLARLLIDPINRMGRFTFYTGAGKPSLIAIEKALATTFTDQPTQQGQRHDGDLVNNLKIARDHR
DIVHGISFSIPRGSHIAVVGPSGAGKSSVALALSGLLEFDGAISLGGHNCEMLDRASVSFPQSPTLFSGSIKSNIIDLARTG
VDSDHIAALLGEELPADLKVGGETKGVSQGQAARIISIARGLVKNAAVIVLDEATAQLDYTNARQVRHLAKSLECTLVEITHR
PSEALDADFIIVLEDGQLTMDTPSNVSQHNAFFRTAVMEEQ

RXN02074 - 5' - Region

CGGGGGAAAGGCCGTGTCGCATGCTCGGCTAGCCTGGATCTCAAGAAGAATTGACTGGTTAAAGTCTGGCTTAAGTGC
AGAAAGGTTGTGGATTG

RXN02074 - kodierende Region

ATGCGCTCCCTGCTCGTATCCCTGCGGTGGTTGGCTAATCACCGCAGCATTGTTGCGCACCGCTCGTTGCGCT
GGTCATCGTGGGATCGGCTTGCTTATCGACGTCCCTCGCCCGCTATTAGCCATGTTGTTGGTGGGTTCTGGCAGGTGCCA
CGGCAGCAGCTGCGCTGCTGTGCGGAAAGCGGTCTCCCCAACGTTACGTGACAGTGAACGATCCTGGCGGCG
TTGGCTGCTAAAATCTGGAGCTGAATTCCAGTCAGATGATGCCAGTTGATCACACTGGCAACTGAAGCCACCTCAA
AGCATCCACTTACACAGTGATGTTCTGGGCTTACTTTGAGTATTGGCCACTGACAGTTATTGCGTTGTCGGG
GGCTATTTCCTGGCGATTGGGGGATACTGTGCTCGGGTTGTGCGTGTACCTTCGTTATTCTGGGACAGCGCATG
GAAAGCGCTGGCGGGATACGGCGAGCATCTGGCAGTTGGCAGGCAGTTGGGACAGCGATGTTGGAAATCGGTGCG
CACACTAGGCACCGATGATGCTGAATGCCGCTGGCAGCGCAGGAGATCATCACACAGCGCAGAGAAATATGCGCT
TGCTGTACCGAAATCAGTTGATGATTCTGGTGACCGACGGCGTGGTGGAGTTGCCACCACAATGGTTGCTGCG
ATTGGAGGATTCTTTCAGGCTCTTACTCTCGCCAAGCTGTAGCACCTGATTGCTGGCCAGGCTGCTTATTGAT
CAACCGCATGGTCGACGTTTACACCGCATGGCAGGAAACCCCTCGCTGATGCCATTGAAAAAGCCCTCG
GACAACCTTTACTGATCAGCCAACAGGGACAGCGCACGATGGGATCTGGTGGTCAACAACTGAAAGAT
GACATTGTGACGGTATCTCTTCAGCATTCCCCCGGTTCCCACATCGCGGTGGTAGGTCCAGTGGCG
TGTGGCTCTAGCGTTGTCGGACTTTAGAGTTGATGGTGC
GCGCCTCAGTCAGTTGCGCCCAATCCCCCACGCTGTTAGCGGAAGC
GTTGATTCTGATCACATCCACGCAC
CTCCGGCGCCAAGCAGCACGCATTCCATTGCCCGAGGTTAG
CACAACTCGACTACACCAACGCCGCCAGGTTG
CCATCAGAAGCCCTCGATGCAGACTTCATCATTGTTAGAGG
CCAGCACAATGCGTTTCCGACCGCTGTGATGGAGGAAGAACAA

RXN02074 - 3' - Region

TGATTTCGGACTTCTCCAATTG

RXN01141 translatiert von RXN01141 (9956) von 1 bis 825
LSTALAGAARYVTSTSNNEPADNTPLTIGYVPIAGSAPIAIA DALGLFKKHGVNVLKKYSGWSDLWTAYATEQLDVAHMLSP
MTVAINAGVTNASRPTELSFTQNTNGQAITLASKHYGSVNSAADLKGMLGIPFEYSVHALLRDYLVSNAVDPIADLELRLL
RPADMVAQLTVEGIDFIGPGPFNERAISNGSGRIWLLTKQLWDKHPCCAVAMAKEWKAEHPTAAQGVLNNALEEASAILSNSPA
QFDSSARTLSQEKYLNQPATLLDGPS

RXN01141 - 5'-Region

AAAGAACACTCGGTATGGCACCTGATTAAAGGATGCTGCAATCGTACACATATCCTCTTCGACAGCAGCGTTCTGCAAC
TGGGCCTTGTGGTCC

RXN01141 - kodierende Region

TTGAGCACCGCATTGGCCGGAGCGGGCCCGTACGTGACGTCGACAAGCAATAATGAACCTGCGGATAACACTCCCCTGACCAT
TGGCTACGTGCCTATTGCGGGCTCGGCCGATTGCTATCGCAGATGCGCTAGGGCTGTTAAAGAAACACGGCGTGAATGTCA
CGTTGAAGAAGTACTCAGGCTGGTCCGACCTGTGGACCGCCATGCAACAGAGCAGCTTGTGATGTTGCCACATGCTGCGCCG
ATGACTGTGGCGATTAATGCTGGAGTGACCAACCGCTCGGCCGACGGAGCTGCTGTTACCCAGAACACCAATGGCAAGC
AATTACCTTGGCGTCAAAGCACTATGGTTCCTGCTCAATTGAGCGGGATCTAAAGGCATGGTGTGGAAATTCCCTTTGAAT
ATTCACTCCATGCCGCTGCTCTGCCGATTATCTGCTCTAAACGCAGTTGATCCCATGCCGATCTGAGCTTCGCCGCTGCTC
CGACCTGCCGATATGGTCGACAATTGACAGTTGAGGGCATCGATGGATTCAATTGGGCTGGGCGTTTAATGAACGCCAT
CAGCAATGGCTCCGGGCGATTGGCTGCTGACCAAAACAATGCTGGGACAAACATCCATGCCGCTGGCGATGGCAAAG
GGTGGAAAGCTGAACACCCACGGCGCTCAGGGTGTGCTTAATGCCGCTGGAGGAAGCCTCCGCAATTGAGCAATCCGGCA
GATTGATTCCCTCGCACGCCACGCTGCGAGGAAAAATACCTCAACCAGCCTGCCACGTTGCTGGATGGACCCTCG

RXN01141 - 3'-Region

TAATCATCGGCATCACCGGCTTA

RXN01142 translatiert von RXN01142 (3960) von 1 bis 498

LTARGNIDFGLRSARPSLSKTERADITRTHLEQVGLTAAERRPARLSGGMQQRVGIARAFAIIDPPIMLLDEPFGALDALTRR
ELQLQLLNIWEASRRTVVMVHDVDEAILLSDRVLVMSKSPEATIITDIPVNLPRLPRHELSEDASVEAETTALRKRLHLLEH

RXN01142 - 5'-Region

CTCCCCATCCACCGGCACAGTCAGCGCAGGCAACGAAGAAATTAAAGGACCAGGACCTGACCGAGGCATGGTTTCCAAGACC
ACGCCCTCCTGCCCTGA

RXN01142 - kodierende Region

TTGACCGCACGCCAACATCGACTTGGGCTCCGCTCCGCCCTCCTTGAGCAAAACCGAACCGGCCACATCACCCG
CACCCACCTCGAACAAAGTAGGCCTCACCGACGCCGAACGGGCCCGCCCGCCCTCTCCGGCGGCATGCAACAGCGAGTCG
GCATCGCACGCCCTCGCCATCGACCCACCAATCATGCTTCTCGACGAACCCCTCGGCCCGCCCTCGACGCCCTCACCCGCC
GAACCTCCAGCTCCAACTAACATTGGGAAGCCTCCGCCGCACCGTCGTATGGTCACCCACGACGTCGACGAGGCCAT
CCTGCTCTCCGACCGAGTTCTCGTATGTCCAAGAGCCCCGAAGCCACCATCATCACCGATATTCCAGTGAATCTCCCCGCC
CCAGACACGAGCTGAGTGAAGACGCTTCTGTTGAAGCCGAGACCACAGCCCTGCGTAAGCGGATGCTGCATCTGCTGGAGCAC

RXN01142 - 3'-Region

TAGTTCTAACACGTCTTTAAA

RXN00523 translatiert von RXN00523 (9218) von 1 bis 1026

MSLSHQLKRQRASRNSRRWLIVAAALGVVTLGIFAFSLMWGEVFYGPAQVLKVLSGQQVPGASYSVGVLRLPRAVMGLTAGLAF
GAAGVIFQTVLRNQLASPDIIGISSGASAAGVICIVFFGMSQSVAISLCASLAVALLIYLVAYRGGSATRLILTGIGIAA
MLNSLVSYSLSKADSWDLPTATRWLTGSLNGATWDRAAMPLIVTTVVLIPLLVANARNVDMRLGNDSAVGLGVATNRTRVIAI
IAAVALIAVATAACGPIAFVAFVSGPIAARILGSGSIIIPSALIGGLIVLIADLIGQYFLGTRYPVGVVTGAFGAPFLIYL
IRSNRAGVTL

RXN00523 - 5'-Region

TGGTGAACCTCGTCCGAGTGAAATTGCCGTGGGCATCATCATGCCATCATTGGTGC GCCACTGTTATTGGATTATTCGTCGT
CAGAAAGTCAAAGAGCT

RXN00523 - kodierende Region

ATGAGCCTTAGCCATCAACTCAAGCGCAGCGCGATCGCGAACCTCCGCAGGTGGCTGATTGTTGC CGCATTGGCGTCGT
CACGCTTGGTATTTTCTTTCTTGATGTGGGCGAGGTATTCCGTGGCGTTGCCTTGCGCGCGGTGATGGGTTTGACTGC
AGCAGGTTCCCGCGCAGTTATTCCGTGGCGTTGCCTTGCGCGCGGTGATGGGTTTGACTGC
GGCGCGCCGGCGTGTGATTTTCAGACGGTGTGCGTAATCAGTTGGCGTCGCCGATATTATCGC
GGCGCGGGCGTAAATTGCAATTGTGTTTTGGGATGTCGCACTGCAGTGTGCGCATTTC
TGGCGTTGTTGATTTATCTGGTGGCGTATCGCGTGGTTTTCGGCCACGCCTGCTGATTCTTACCGG
ATGCTGAATTCAATTAGTGTGCGTATTGCTGTCACAGGCTGATTCTGGGATCTGC
GCTCAATGGTGGACGTGGGATCGCGATGCCGCTGATTGTCA
GCAATGTGGATCTTATGCGTTGGCAATGATTCCGGTGGTTGGCGTGC
ATTGCCGCTGTGCGCTATGCCGTTGCTACCGCTGCATGCC
CGCGCGCATTAGGCTCCGGGGATCGCTCATC
TTGGCCAATACCTCTCGGCACCCGCTAACCGCGTGGAGTTGT
ATTCGTTCCAACCGCGCGGGAGTAACCTG

RXN00523 - 3'-Region

TGACCAACCAACCATCAACTATCC

RXN01285 translatiert von RXN01285 (1049) von 1 bis 726

LNVTIPDNTFTAIIGPNGCGKSTLLRGFSRVLNPQHGVLLDGRQLDSFKPKIAREGLLPQTSIAPEGIRVYDLIARG
RAPYQSLIQQWRTSDEDAVAQALASTNLTEAARLVDELGGQRQRVWVAMLLAQQTPIMLLDEPTTFLDIAHQYELLEL
LRAFNEAGKTVVTVLHDLNQAARYADHLIVMKDGHVHATGTPEEVLTAEMVQGVFGLPCIISPDPVTGPTVVPLRSRA
GA

RXN01285 - kodierende Region

CTAACACGTCAACCACCCGACAACACCTTCACCGCCATCATGGCCCCAACGGCTGCGCAAATCCACCCCTGCTCCGCGG
TTTCTCCCGCGTGCCTCAATCCGACGGCAAAGTGCTTCTGACGGTGGCAACTCGATTCAAGCTAAAGAGA
TCGCCCCGAGAACTAGGCCTGCTGCCACAGACCTCCATCGCCCCAGAAGGCATCCGGGTTTACGATCTCATCGCGCGCGGG
CGCGCTCCCTACCAAAGCCTCATACAACAATGGCGCACCTCCGACGAAGACGCCGTGCGCAAGGCCTCGCCCTCACGAA
TCTCACCGAACTTGCAGCTCGCCTCGTCGATGAACTCTCCGGTGGCCAGGCCAACGAGTGTGGTGGCATGTTGCTCG
CCCAGCAAACACCGATCATGCTTCGACGAGCCCACCCACCTTCCTGACATGCCAACCAATACGAACTCTTGAATTG
CTGGCGCATCAACGAGGCCGGAAAATGTGGTCACTGTGCTCACGATCTCAACCAAGGCCGCCGTACGCCGACCA
CCTCATCGTGATGAAAGATGGGCACGTACATGCCACGGCACACCGAGGAAGTCTTAACGCCAGATGGTTCAAGGAG
TTTTTGGCCTGCCCTGCATCATCTCCCCAGACCCCGTCACAGGAACCCCCACCGTGTCCCCCTAGTCGGTCTCGCGCA
GGAGCT

RXN01285 - 3'-Region

TAAGTAGCTACCCCTCCAACCGA

RXN00368 translatiert von RXN00368 (9416) von 1 bis 1575

MRLGVWLIVAGLFITPLALVVLALGGNQFPALWDSGLGKALWNSAYTTVLSAVGATIIGTIMALTLDRDVFGRALRLFLL
SPLLIPPFIGAIawlQLFGKNQGINRFFGTEVWDIYGADGVTFLILVHSYPTVYIIVSAALRQLPSDLEQAARIAGADTFVL
RTITLPLLPALLPALLSAFTLTTVANLADFGIPALLGSPARFETLATMIYRFMESTVSNPLQVNSTIGIVLLFLGIAAVTADYLV
SLYAASKLQDAGTPHRFTLNKSRIPVSVITWIIALIITAAPLLGLAYRALLPAPGVFNLNDNITLNNEAALSNPRVIEGFSN
SLMLSLGAALICGVLGWLIGVLIRTRQHFANVPLTLPTALPGMIIIGVGWLILGRYTGIVNTPWVILGAYVCAFTALVVQ
AVRGPLSQAPEAIEEAARISGAGRLRSIMDTTGAMAIPAAFAGAVLVAVTAVRELTVSILLIAPGTTLGVQVFNLQQAGYN
QASALSLMFAIIGIVALALTVRSQKEF

RXN00368 - 5'-Region

TTCTTCCAAAACGCAATGAACTAGTTTCCTATGCAGTTATCTCCTCAAATACGTCGACGCAGCGCTTCACATCTCTGCGT
TGACGTCTTGCTTT

RXN00368 - kodierende Region

ATGCGTCTGGGTGTTGGCTGATTGTGCGGGGTTGTTTATCACTCCGTTGGCGCTGGTGGTGGGCTTGGCGTTGGGAGGC
TCAGTTTCTGCTCTGGGATTCCGGATTGGCAAAGCCCTATGAAATTCCGCTATACAAACAGTGCTTCTCGGGTGGCG
CGACCAATTATCGGCACGATCATGGCTCTCACGCTGGACCGAACTGATGTTTGGGCGACCCGGTTGGGTTATTTTGT
TCCCCGCTGTTGATCCCTCCGTTATTGGGCTATTGCGTGGTGCAGCTGTCGGGAAGAACCGGGCATCAACCGGTTTT
CGGCACGGAAGTGTGGGATATTACGGCGCTGATGGTGTGACATTGTTGATGACTCCTATCCCACGTGTACATCA
TTGTTCGGCAGCTCTGAGGCAACTTCCTAGTGATTTGGAGCAAGCTGCACGGATCGCGGGGGCGGATACTTTACGGTGT
GGCACCATCACACTCCCACGCTCAAACCTGCATTGTTGCGCTTACTCTACACAGTGGCAACCTCGCCGACTTGG
CATTCCAGCTGTTGGGATGCCAGCGCTTTGAAACCTTAGCCACCATGATTATCGCTTCATGGAATCCGGCAGCG
GCAATCCATTGCAAGGTGGTATCCACCATTGGCATCGTGTGTTCTGGGATCGCAGCAGTAACCGCGATTATCTGGT
TCTTTGTACGGGCATCAAAGTTGCAAGACGCAGGAACACCGCATTGCTTACTCTCAACAAATCAGCAATCCAGT
GATCACGTGGATCATCGCGTTGATCATCACCGCCGCCCGCTGCTGGGCTGGCATACAGAGCATTACTGCGCT
TGCGTTCAACCTAGACAACATCACGCTCAACAACATTGAAAGCAGCAGTGAGCAATCCACGGATCGAAGGATT
TCCCTCATGTTATCCCTGGGTGCAGCCCTAATCTGTGGGGTGCCTGGGATGGCTGATCGGAGTGCTCAT
CCCCGAACCCAGCA
TTTCGCCAACGTACCGTTGACACTCACTGTGCTGCTCCACCGCAGTGCGGCTGGCATGATCAT
TGGGCAGATAACCCGGAAATTACAACACACCTTGGGTGATTTGGGTGCATATGTGTGCTTTACGGGCTGGTGTCAA
GCTGTACGGGACCAACTCAGTCAGCAGCAACCGAAGCAATCGAAGAACGGCAGCAATCAGCGGCGCAGG
CATGGACACCACCGGAGCGATGGCAATTCCCGCAGCTTCGCCGGCAGTGCTGGTTGCGGTAACT
CCGTGTCCATTGCTCATCGGCCGGCACCAACCCCTGGGTGTCAGGTGTTCAATTGCA
CAGGCGGGAAATTACAAT
CAGGCATCGGGTTGTCGTTGATGTTGCGATTATCGGTATCGTGGCGCTCGCGTTGACGGTGCAGCCAGAAGGAGTT

RXN00368 - 3'-Region

TAGGTGTCATCGATCAAATTGCG

RXN02613 translatiert von RXN02613 (5283) von 1 bis 957

MKFKKIALVLAFLGLASCSSASGDPATNADGSIDLSKVTLNIGDQIAGTEQVLQASGELEDDVPYKIEWSSFTSGPPQIEALN
AGQIDFAITGNTPPIIGGPTNTKVVSAYNNDALGDVILVAPDSSITSVADLAGKKAVARGSSAHGLIQQLEKAGVSVDV
INLLQPSDAKAAFQNGQVDAWVDPYSSQAELEGAQVLVRGAGLVSFGVVASDEALDDPAKEAALADFLDRVADSYEWA
DNTDEWATIFSQESGFDPEASQLNTRSLRHQVPLDESVNTYQNALIDAFVSAGLVEDFNFEDTVDTRFEG

RXN02613 - 5'-Region

AGATATCCCCGGCGATCGCCGACCCACCCCTCCTTGCCTCCTACACCGCTCAACTCCTGAGTGGCTCGAAATCACCACAC
CTGCCCTAGAAAGAAATC

RXN02613 - kodierende Region

ATGAAATTAAAGAAAATGCCCTCGTCTCGCCTTCGGCTAGGCCTTGATCCTGCTCATCAGCTCTGGCGATCCGCCAC
CAACGCCGATGGATCCATCGATCTGAGCAAAGTAACCCCTAACATCGGTGATCAAATGCCGGAACAGAACAAAGTGCCTCAAG
CTTCAGGGAGCTAGATGATGTCCTTAAATCGAATGGTCATCTTACCTCTGGACCACCCCAAATCGAAGCATTAAAC
GCAGGTCAAATTGATTCGCATCAGGAAACACCCCAACCGATCATGGCGGCCCCACCAACACCAAAGTGGCTCCGCCA
CAACAACGATGCTTAGGTGATGTCATCTGGCGCCCGATTCTCAATAACCTCGTGGCTGACCTTGCTGGAAAGAAAG
TGGCTGTGCCCGGGATCCAGGCCAACCTCATCCAACTAGAAAAAGCAGGGTGGCTGACGACGTAGAA
ATCAACCTCTCAACCCCTCGACGCCAAAGCCGCTTCCAAAAGGCCAGGTAGATGCGTGGGCAGTGTGGGATCCCTACAG
CTCACAGGGCGGAACTGGAAGGAGCTAAGTTGGTCAGGGGAGCGGGACTGGTCAGTGGCATGGATTGGTGTGCAAGTG
ATGAAGCGCTCGATGACCCCGCAAAGGAAGGCCCTGGCAGATTCTCGATCGCGTGGCCGACTTTATGAATGGCTGAA
GACAACACCGATGAATGGCGACGATTTCAAGCAAGAATCCGGCTTGATCCGGAGGCTCTCAACTGAACACCCCGAGCCT
GGCCATCAGGTGCCGCTCGACGAGTCCGTCAACACCTATCAGAACCGCTTATCAGCGCTTCGTCCTCCGGGGTCTCGTTG
AGGACTTTAATTCGAGGACACCGTAGACACCCGATTTGAGGGC

RXN02613 - 3'-Region

TAAGTATGTCTGAGTATGGCAAA

RXN02614 translatiert von RXN02614 (5216) von 1 bis 729

MTATLSLKPAAATVRGLRKSYGTKEVLQGIDLTINCVEVTALIGRSGSGKSTILRVLAGLSKEHGSVEISGNPAVAFQEPRLL
PWKTVLDNVTFLNRTDISWSEAQERASALLAEVKLPDSAAWPLTLSGGQAQRVSLARALISEPELLLDEPFGALDALTRL
TAQDLLLKTVNTRNLGVLLVTHDVSEAIALADHVLLDDGAITHSLTVDI PGDRRTHPSFASYTAQLLEITTPA

RXN02614 - 5'-Region

TCATTGTATAACGCCACCCCTCGGTCTGCTGTCTGAAGCGCTGATCAGAGCTTGGAACGTACACACCTCCGCTACCGAAACGCA
TAAGAAAGTTGCTCGCC

RXN02614 - kodierende Region

ATGACTGCCACATTGCACTCAAACCCGAGCCACTGTCCGTGGATTGCGCAAATCATAACGGAACTAAAGAAGTCCTCCAAGG
AATCGACCTCACCATCAACTCGGGCGAAGTAACCGCGCTGATCGGACGCTCAGGTTCAAGGAAAATCCACCATCCTGCGCGTGT
TGGCGGGCTATCTAAAGAGCATTCCGGCTCTGTAGAAATTCCGAAACCCGGCCGTTGCCCTTCCAAGAGCCTCGCCTGTTG
CCGTGGAAAACGGTGCCTCGATAATGTGACCTTGGCCTCAACCGCACTGATATTCCCTGGTCAGAAGCACAAGAACGCGCCTC
GGCACTGCTTGCAGAAGTCAAACTTCCGACTCCGACGCCGCTGGCCCTCACGCTCTCCGGGGCCAAGGCCAGGCGCT
CCCTTGCAGCGAGCGCTCATCTCCGAGCCAGAGCTTGTCTCGACGAACCCCTCGGCGCCCTCGATGCTCTGACAAGACTG
ACAGCCCAAGACCTGCTGCTCAAAACCGTGAACACCCGAAACTTGGAGTTCTGCTGGTACCCATGATGTTCCGAGGCCAT
CGCCCTGGCCGACCACGTCTTCTTGACGACGGCGCCATCACACACAGTTGACTGTAGATATCCCCGGCAGCGCCGCA
CCCCACCCCTCCTTGCCTCTACACCGCTCAACTCCTTGAGTGGCTGAAATCACACACCTGCC

RXN02614 - 3'-Region

TAGAAAGAAATCATGAAATTAA

RXN02547 translatiert von RXN02547 (8918) von 1 bis 2139
 LELNNAAARLTVD E P A R E A L E S A G Q R N V E D R T R A V D E F K A A D Q E L S S L K G S S N I E Y R L L Q V R E N L C Q D L G V S P R D M P F A G E
 L I D P N N A E W E P V V Q R I L G G F A A E M L V P H G L L P R V R D W V N A K H L A A L L K F N G V V T T G E Y K T S R F P A D S L I R K V D V V E S P F R D W V
 N Q E L G K R F N I R C V R T P E E L S A L G P R D Q G V T I L G V R K F A Q Q T G D P T T R W E K D D R R K L G D R S T Y R L G S T N D A K V E T L R E T V K A G K
 A V V Q A A D N R I A A N R A E L R E L E R Q Y Q A S Q E I L K V S W A Q I D V E S A D A A I A E L D R I L L E E L N N T P E A T E L S A R H E A A K Q T L A R V S D L
 L V A A Q S E E T V A S M N L K R A E T E L K R L E S L P V A E V S E E I A R E V E K L F L A N T R R V H A A N V D E Q T I A L R E D L D K Q I D A N E A E L R R C E
 N Q I V G I L R S Y I E T W P A N R A D L Q A E P E F V G E A I N R L G E L R S D R L A E F T A K F L G L M N E M S T R N L G Q I S R R L R D A R R E I E E R I P I
 N A S L A Q S E F N E G R F L H I D I R D Q S G P I V R E F Q Q K L D A A T S G D L G T S T E K Q A F A R Y A L I A E I I S K L A S H D S A D A R W R N T V L D T R R
 H V R F I G L E R D S D G A T V N T Y V D S A S L S G G Q A Q K L V F F C L A A L R Y Q L A E P G A H Y P T Y A T V I L D E A F D R A D P A F T R Q T M N V F H S F
 G F H M V L A T P L K L I Q T L G D Y V G S T I V V S Y T E K P N A Q G A I Q G N S S F S R I E K

RXN02547 - 5'-Region

GGGGCCGTCGATAAGCGAAGAACATTAGCACTGGCGCCGCTGGCTGACGCATTGGTTAAGGGGCTGGCGGCCGG
 AATCGCGCGAGGAGCTT

RXN02547 - kodierende Region

TTGGAGCTCAACAACCGCTGGCGGCTGACCGTGGATGAGTATCCGGCGGAGGGAAAGCGCTTGAATCTGCAGGTCAAGGAA
 TGTAGAGGACCGAACCCGTGCGGTTGAGTCAAAAGCGGCGATCAAGAGCTGCTTCTTGAGTAAAGGCAGCAGTAATA
 TTGAGTACCGTTGCTGCAGGTGCGGAAAATTGAGTGTGAGGATTGGCGTGGCCGAGGATATGCCCTTGCCGGTGAG
 CTGATTGATCCGAATAATCGCGGAATGGGAACCCGTTGTCAGCGCATTGGTGGTTTGCTGCAGGAAATGTTGCTCCCA
 TGGGTGTTGCCACGGGTTGGGATTGGTAAATGCCAACATTGGCAGCGCTGCTGAAATTCAACCGCGTGTGACAAACGG
 GGGAGTACAAAACCTCGCGTTTCCGGGATTCGGGATTCGGGATTCGGGATTCGGGATTCGGGATTCGGGATTCGGGAT
 AATCAAGAATTAGGAAGCGTTTAAATATTGCGTGCCTGCGACTCCTGAGGAATTGTCGGCGTGGGGCCACCGGATCAGGG
 CGTGACCATTTGGGTGCGAAAATTGCGCAGCACAGCGATCCGACGACGCGTGGGAAAAGATGATGCCGAAAGC
 TGGGGATCGTCCACATACCGTTGGGTTCCACCAATGATGCCAGGTGGAAACGCTTGGGAAACCGTGAAGCTGGAAA
 GCAGTGTGCAAGGAGCTGATAATGCCATTGCTGCAAACCGCGCTGAGCTGGGAAACTGAAACGGAGTATCAAGCTTCGCA
 AGAAAATTGAAAGTGTGCTGGGCTCAGATTGATGTGAAATCAGCCGACGGCGATTGCTGAGCTGGACCATTGCTGGAAAG
 AGCTGAACAAACACTCCAGAGGCCACCGAGCTTCCGGCGCATGAGGGCGGCAAGCAGACGCTCGCGAGGGTTCTGACTTG
 CTTGTCGAGCTCAGAGTGAGGAAACCGTGGCGTGAACCTGAAACCGCGGAAACTGAAATTGAAACGGCTCGAAAGCCT
 GCCGGTTGCGGAGGTTCTGAAAGAAAATCGCGGGGAAGTGGAGAAAACTATTCCTGCAAACACCCGGGTTACGCCGCC
 ACGTGGATGAGCAGACCATTGCGCTGCGAGGGATCTGGACAAACAAATCGATGCCATGAGGCAGAAACTTCGACGTGTGAA
 AACCAAATTGTTGGCATTGCGCAGCTATATTGAAACGTCGGCTGCGAACCGCGCTGACTTACAAGCCGAACCTGAGTTGT
 TGGTGAGGCCATCAACCGCCTCGCGAGCTTCGCAAGCGATCGTTGGCAGAATTACGGCCAATTCTAGGGCTCATGAACG
 AGATGTCACCCGAAACCTCGGCCAAATCTCGCGCGTCTACGTGATGCGCGCCGGAAATCGAGGAGCGATCGAGCCGATC
 AACGCCCTCTGGCGCAGTCGAATTCAACGAAGGTGCGCTTCTGCAACATCGACATCCGTGATCAAAGTGGTCCGATTGTGAG
 GGAATTCCAGCAGAAACTTGATGCCCTACCGAGCGGTGACCTGGGAACCGAGTACCGAGAAACAAGCTTCGCGGTTATGCGC
 TGATCGCTGAAATCATTCCAAACTCGCCTCCACGACTCCGCCACGCCGCTGGCGAACACCGGTTCTAGACACCCGCC
 CACGTTGCTTCATCGGCCCTCGAGCGCATTCCGACGGCGCAACCGTCAACACCTACGTGACTCCGATCACCTTCAAGCGG
 ACAAGCCCAGAAGCTGGTTTCTGCGCTGCGCTTGCGCTACCGAGCTAGCGAACCCGGGCCATTATCCCACCT
 ACGCCACCGTCATTCTGGACGAAGCCTCGACCCGCCGACCCGCCATTACCCGCCAAACCATGAACGTCTCCACAGCTTC
 GGCTTCCACATGGTGCCTCGCAGCCCGCTGAAACTTATCCAACCCCTCGCGATTATGTCGGCTCCACCATCGTGGTCAGCTA
 CACCGAAAAACCAAACGCCAGGGCGCAATTCAAGGGCAATTCCAGTTCTCTAGGATCGAGAAA

RXN02547 - 3'-Region

TAACATGCCATTGTTATCGACG

RXN01604 translatiert von RXN01604 (7962) von 1 bis 648
MNTPLLRSSGLSIRDTPFADVEIAPDGLTLLSTGRESQSSFSVLSGRMRASTGTIELNGEPIKATKLAKHVALAGIPEID
SLERLVTVRTVREQLAWSSPWYLMVPRDISDSGRWVDVEKHLGLNLNPKTLIGDLSVLERFKLRIALALLARPEAQLLVDD
PDQVRSMELRAEVLHALKGVAEDLPVVVSTNPDFDSLADTALTITGAGN

RXN01604 - 5'-Region
CTCTCATGTTGTTGTCCTCTAGTTGACAGCGGGGTGGTGGTGGTCTAAAATAGCCTACGATAACTGATAGTGTTCCTCCA
CTTACCGAAGAAGATAC

RXN01604 - kodierende Region
ATGAATACCCCTCTTTGAGAAGCTCTGGGCTCTCCATCCGCACACACCCTCGCCGATGTTGAGATAGCTCCAGACAGCGG
ACTCACTTGTGAGCACCAGCGCAATCCAAATCCAGTTCTTCTTGTACTTTCCGGCCGATGCGCGCTCCACCG
GAACCATCGAATTAAACGGCAACCCATCAAGGCAACCAAGCTGGCAAGCATGTGGCTTGGCGGGCATCCCTGAAATCGAT
TCACTCGAGCGACTTGTCACTGTGCGCACCGTTGTCCGTGAACAACACTCGCCTGGTCAAGCCCTGGTACCTGATGGTGCCCAG
GGATATTAGTGTGATTGGGACGGTGGGTTGACGTCGAAAGCATCTGGCCTGAACCTGAAACCTTAAACCTTAAATCGGCGACC
TCAGCGTGTGAGCGTTTAAGCTGCGATCGCCTGGCGCTGCTGGCGGCCAGAGGCGCAACTGTTGGTGTGGATGAT
CCCGATCAAGTGCAGCATGGAATTGCGTGGAGGTGTTGCACGCATTGAAAGCGTTGCAGAGGATCTCCCTGTGGTCGT
GGTATCCACCAACCCAGATTTGATTCTGGCGATACCGCTTGACCATTACGGGGCTGGAAAC

RXN01604 - 3'-Region
TAATGGCATTTCACACTTGGC

RXN00456 translatiert von RXN00456 (2097) von 1 bis 1377
 VLQALLAIMVSLVAAILEGNRALVGLLATTLGLGVAQWIQKVAEDLGQHYVHEVRELVGAALVPGNTASLGVTVTRASN
 DLTAVRNWALGIVPMVTGLPLIAIVLVALFIQDLRTGVAVTPVLLMCVAVLPVARWTLKRARELRKGRMAARIADSVMA
 GELLHATGAIDRELNAVTRDSDRVIAAVRRSWATGFSRALMAMAASLGTVSIVISGHLEVSEAGIMMLGVLATPVAELGR
 VVEYRQNYKAATRILIPLLQRGSEFKHSQQKLPGLQATEGIPGVYVKGISALPERIYLHGSADATRKWVTSLSAMEEGTDVI
 VNGQLSQLPLKQRRALIGIASAHHHLSRGSVSRLVGLRVPDATVEEIEQALEQVGLNNNTGQRLKNGGHPWSTSQINKLKIA
 SATLRTPPLLVLLEGITPENLLNYPGVIIISTVQENPSETWRQVNI

RXN00456 - 5'-Region

CTCACCAACCCGGAGATCGTCACAGCGGTGCTAACGGATCATGCCTAGCTTATGGCGTGCCTCGCAGACTTTGCTCATTG
 CCCTAGGTGTACTTGGT

RXN00456 - kodierende Region

GTGCTGCAGGCAGTCATGGTGTGTTGAGCGTAGCCGCCATACTGAGGGAAACGAGCACTTGGTGGATTGCT
 GCTTGCCTACCACGTTGGGTTGGGGTGGCGCAGTGGATTCAAAAGTAGTGGCAGAAGATCTAGGCCAGCATTATGTGCATG
 AGGTGGCTCGTGAATTGGTGGGTGCTGCCTGGTGCCTGGAAATACGGCCTCGTGGCGTACTGTCACCCGAGCCAGCAAT
 GATCTCACCGCGGTGCGCAATTGGGTTGGCTTGGCATTGTTCCGATGGTCACCGGGCTGGCGTTGATTGGCATTGTGCTGGT
 GGCCTGTTATCCAAGATCTCCGCACAGCGTGGCTGTACTGTCACGGCCTCGTCAATGTGTGTTAGCCGTGCTGCCGGTGG
 CGCGGGACTTGAAAAGAGCACGTGAACCTACGCAAAACGTGGACGTCAGTCACCCGAGATTCCGACCGAGTGGTGTAGCTGC
 CGAGAATTACTGCACGCAACAGGAGCAATAGACCGTGAACCTACGCAAAACGTGGACGTCAGTCACCCGAGATTCCGACCGAGTGGTGTAGCTGC
 GTAAAGACGTTCTGGCACCGGTTAGCCGCATTGATGCCATGCCACCTCGTGGCACTGTCAGCATTGTGATT
 CTGGCCACCTGGAAGTAAGTGAGGTTGCGGAAATAATGATGCTTCTTGGCTTCTGCCACTCCAGTGCAGAACTTGGCCGC
 GTGGTGGAAATATGCCAAATTATAAGCCGCACACGCACTCTGATTCCACTCTGCAACGAGGCTCAGAATTAAACACTC
 CCAACAAAAACTACCCGGTTGCAAGCAACAGAAGGAATCCCCGGTGTCTATGTCAGGTTATTCGCCCTTCCTGGAGAAC
 GGATCTACCTCCACGGCTCTGCAGATGCGACGAGAAAATGGGTACCTCGTGTCTGCAATGGAGGAAGGCACAGATGTAATA
 GTCAACGGTCAAAGGCTTTCGAGCTCCTTGAAACAACGACGCCCTCATCGGAATGCCCTCAGCACACCACCTTAAG
 CCGTGGTTCAAGTATCGCGCTGGTTGGGTGCGAGTGGCAGGAAATGAGCAAGCAGTGGAAACAAGTTG
 GTCTGAACAAACACCGGGAAACAACGCTTGAAAACGGCGACACCCCTGGAGTACTTCGCAAGATCAACAAACTGAAAATTGCC
 AGGCCACCCCTCGAACCCACCGTTGGTACTTGAAGGCATACCCCTGAAAACCTCCTCAACTATCCGGAGTGATCAT
 CTCCACCGTTCAAGGAGAACCCATCGAAACATGGCGCAAGTGAACATC

RXN00456 - 3'-Region

TAATCTAGAAACATGGCAGGACG

RXN00243 translatiert von RXN00243 (3186) von 1 bis 1017
VTSEQALDPIHPGQFRLSRIQLINWGTFHGTVDIPVTREGILVTGGSGSGKSTLIDAITAVLLPQGKLRFNSAAQANTPRNKG
RSLVTYIRGAWRAQEDPLQDQIVSTYLRPRATYSLVGLTYSNCEGVEHTLVAIFYLKSGHNLTSIDISSYYGVFPVDQDINALL
DFLKEGIDKRQIRAAFKEAIFSEQHSVFSGRFRSRLGISSSEEALLLHRAQSAKDLQSLDDLFRDYMVLVEPDTFSIAKTAVEQ
FQDLEGAYEQVEDIKRQIHTLDPLVQLKNRREKAQQSKDHANALKALPTVGNRIKKEEQQEPLVRQFTVEQTQRSRRWSPPKL
RQIVPAK

RXN00243 - 5'-Region

CACTGCCAGATTTGATGCCGACACTGTGGCAGGTGTGCGCGCTGAGTACGAAAAATTAAACAAAGCAGCCCAGTGGAA
AATGAAGAGGAACAGAA

RXN00243 - kodierende Region

GTGACCCAGCGAACAGCTTAGATCCTATCCACCCAGGTCAAGTCCGTCTTCGGATTCACTGGAAACCTT
CCACGGAACGGTGGACATTCTGTGACCAGGGAAAGGAATCTTAGTTACCGGTGGTCGGGATCAGGAAATCCACGCTGATTG
ATGCGATCACGGCGTATTGCTCCGCAAGGAAAGCTGAGGTTAACCTCTGCCGACAGGCTAATACTCCGCGAATAAGGA
CGCAGTTGGTACCTATATCCGTGGCCTTGGCGTGCAGGAGGATCCGCTGCAGGATCAGATTGCTCCACGTACCTACG
TCCCCGGCAACCTATTCCGTGGATTGACTTATTCCAACGGTGAAGGGCTCGAGCACACCTGGTGGCTATTCTATC
TGAAATCGGGACACAATTAAACCTCCGATATTCTCATATTATGGTGTGTTCCCGTTGATCAAGACATCAATGCGCTGCTG
GATTTCTGAAAGAGGGCATCGATAAACGCCAGATCAGAGCTGCTTCAAGGAAGCCATCTTAGCGAGCAGCATTCTGATT
CTCCGGCAGGTTAGAACCGTTGGGGATCTCCAGTGAGGAAGCTTGCTGTGACCGCAGTCGGCGAAAGGATT
TTCAAAGCTTGGATGATCTATTCCGGATTACATGCTGGGAACCGGATACGTTCAAGGAAACTGCGTGGAAACA
TTCCAAGACCTTGAAAGGTGCTTATGAGCAGGTGAAAGATATTAAACGGCAGATCCACACCCCTGGATCCTTGGTCAGCTGAA
GAATCGGCAGAGAAAGCGAACAGTCCAAAGATCATGCCAATGCACGTGAAGAAGGCCTGCCACTGTCGGGAATCGCATT
AGAAGGAAGAGCAAGAACCGCTGGTCGACAATTACTGTCGAGCAAACGCAGCGAAGTCGAAGGTGGAGTCCGCCAAATTG
AGACAGATCGTGGCCCGCAA

RXN00243 - 3'-Region

TGAAAACCTCGCCACGACAAC

RXN00411 translatiert von RXN00411 (,5242) von 1 bis 675
MNEMILAADWNRLGPTFQTAIIDTLLMVIITMVVAGLLGLVGLLYTTRAGGILKNKVIYTILNVLFVRPIPIIILIAAI
KPLTVAVMGTISIGRDAGIFVMVVAIFSVARIVEQNLVSIDPGVIEAARSMGASPMRIIATVIPEALGPLVLYTFLFIAIV
DMSAMVGYIGGGGLGDFAIIVGYRAFDNEVMYAVLVIVIIVQAAQLLGNWLSKKIMRR

RXN00411 - 5'-Region

CATTTGGCAAAATGACTGTTGACTCACCGAACACCGCTGCGATTGAAGAGTTCTATCAAACCTTGACCAAGACGACGACC
ATCAAGGAGATCACCG

RXN00411 - kodierende Region

ATGAACGAGATGATCCTCGCAGCTGACTGGAACCGGCTAGGACCCACCTCCAAACAGCCATCATTGACACCCCTGTTGATGGT
CATCATCACCATGGTGGCTGGCTTACTGGTCTTGTGTCGGCCTGCTGCTTACACCACCCCGCCTGGTGGAAATCTTGA
AGAACAAAGGTCACTACACCATTGAATGTGCTGGTGAACTTGTTGACCCATCCCATTCAATTATTTGATCGCCGCCATC
AAGCCACTAACGGTCGCCGTATGGCACCTCCATGGCCGAGATGCCGCATCTCGTCATGGTTGTCGCAGCGATTCTCTC
TGTGGCTCGAATCGTGGAGCAAAACTTGGTCTCCATTGATCCTGGTGCATCGAGGCAGCTCGCTCATGGTGGCGTCCCCGA
TGCGCATCATGCCACCGTGATCATCCAGAACGACTTGGACCATTGGTCTGGTTACACCTTGTTCATCGCGATCGTC
GATATGTCGGCAATGGTGGCTACATGGTGGCGGTGGTCTGGTACTCGCCATTGTTACGGCTACCGCGCCTCGACAA
CGAAGTTATGTACGTTGCCGTCTGGTTATCGTCATCATCGCAGGCAGCCAGCTCTGGCAATTGGCTGTCCAAGAAGA
TCATGCGCCGC

RXN00411 - 3'-Region

TAAACCTTGCATAGAAAACC

RXN00412 translatiert von RXN00412 (7568) von 1 bis 1080
VSHTASTPTPEEYSAQQPSTQGTRVEFRGITKVFSSNNKSAKTTALDNVTLTVEPGEVIGIIGYSGAGKSTLVRILINGLDSPTS
GSLLLNGLTDIVGMPESKLRKLRNSNIMIFQQFNLFQSRTAAGNVEYPLEVAKMDKAARKARVQEMLEFVGLGDKGKNYPEQLS
GGQKQRVGIARALATNPTLLADEATSALDPETTHEVLELLRKVNRELGITIVVITTHEMEVVRSIADKVAVMESGVVVEYGSV
YEVFVSNPOTQVAQKFVATALRNTPDQVESEDLLSHEGRIFTIDLTETSGFFAATARAAEQQAFVNIVHGGVTLQRQSFHKMT
VRLTGNTAAIEEFYQTLTKTTIKEITR

RXN00412 - 5'-Region

CTTTGACGAACACACCACGCGTACGCTTCCCTGGGGCGTTAAACTATTTGTCTTCCAGCTTGTCCCCGACTTTGTAC
GAATCGAGGACACCGTC

RXN00412 - kodierende Region

GTGTCACACACCGCGTCCACACCGACGCCAGAGGAATACTCCGCGCAGCAACCCAGCACCCAGGGCACTCGCGTTGAGTTCCG
CGGCATAACCAAGTCTTAGCAACAATAATCTGCTAAAACCACCGCGCTTGATAATGTCACTCTCACCGTAGAACCCGGTG
AGGTAAATCGGCATCATCGTTACTCTGGCGCCGGCAAGTCCACTCTTGTCCGCTCATCAATGGCCTGACTCCCCCACGGC
GGTCGTTGCTGCTCAACGGCACCGACATCGCGGAATGCCAGTCTAAGCTGCGTAAACTGCGCAGTAATATCGGCATGAT
TTTCAGCAGTCAACCTGTTCCAGTCGCGTACTGCGGCTGGAAATGTGGAGTACCCGCTGGAAGTTGCCAAGATGGACAAGG
CAGCTGAAAGCTCGCGTCAAGAAATGCTCGAGTTCGTCGGCCCTGGCGACAAGGAAAAACTACCCCGAGCAGCTGTCG
GGCGGCCAGAACGAGCGCGTCGGCATTGCCGTGCACTGGCCACCAATCCAACGCTTTGCTGCCGACGAAGCCACCTCCGC
TTTGGACCCAGAAACCACCATGAAGTTCTGGAGCTGCGCAAGGTAAACCGCGAATGGCATTGCGTGTGATGGAAATACGGCAGCGTC
CCCACGAAATGGAAGTTGCGTTCATCGCAGACAAGGTTGCTGTGATGGAAATCCGGCAAAGTTGGAATACGGCAGCGTC
TACGAGGTGTTCTCCAATCCACAAACACAGGTTGCTCAGGTTGCTGCTGCTGGCCACCGCGCTGCGTAACACCCAGACCAAGTGG
ATCGGAAGATCTGCTTACGCATGAGGGACGTCTGTTCACCATGGTACTGACTGAAACGTCGGCTTCTTGCGACGAACCGCTC
GTGCTGCCGAACAAGGTGCTTTGTCAACATCGTTCACGGTGGCGTGAACGCAACGCAATCATTGGCAAAATGACT
GTTCGACTCACCGCAACACCGCTGCGATTGAAGAGTTCTATCAACCTGACCAAGACCAAGGAGATCACCCG
A

RXN00412 - 3'-Region

TGAACGAGATGATCCTCGCAGCT

RXN02096 translatiert von RXN02096 (3261) von 1 bis 1692
 MG LD VS DE QIE HAAR LA QA HD FID RL PN KYEE VIG ER GLT LSG G QR Q R I AL A RA FLA HP KV VL DDAT SA ID AS T ED R IF Q AL
 RE EL HD VT ILI A HR ST LE L G D RV GL V ED GR V T AL G PL S E M RD H A R F SH L M AL D F Q D S H D P E F T L D N G S L P S Q E Q L W P E V S T
 E K Q Y K I L A P A P G R G R G M S P A T P E L L A Q I E A L P A A T E E T R V D A G R L R T S T S G F K L L S L F K Q V R W L V V A V I A L L V G V A A D L A F
 P T L M R A A I D N G V Q A Q S T S T L W W I A I A G S V V V L S W A A A I N T I I T A R T G E R L L Y G L R L R S F V H L L R L S M S Y F E R T M S G R I M T R
 M T T D I D N L S S F L Q S G L A Q T V V S V G T L I G V V T M A I T D A Q L A L V A L S V V P I I I V L T L I F R R I S S R L Y T A S R E Q A S Q V N A V F H E S
 I A G L R T A Q M H R M E D Q V F D N Y A G E A E E F R R L R V K S Q T A I A I Y F P G L G A L S E I A Q A L V L G F G A L Q V T R G D I S T G V L V A F V L Y M G L
 M F G P I Q Q L S Q I F D S Y Q Q A A V G F R R I T E L L A T Q P S V Q I W A P T G T L G R L P R S L Y C L T T S P S A I Q T I R S

RXN02096 - 5'-Region

CG C T T C G A C G A C C T C A C C C A C A G C G A T A T C C G C A G G A A T C T C A T C G C G G T T T T G A T G A G G C G T T C T G T A C T C C T C C T C A T
 A C C G C G A G A A C A T C T C G

RXN02096 - kodierende Region

A T G G G T T G G A T G T C A G T G A T G A G C A G A T C G A A C A C G C A G G C T T G C C C A G G C T C A T G A T T T A T C G A T C G C C T T C C A A A
 C A A A T A C G A G G A A G T C A T T G G C G A A C G C G G C T G A C G C T T C T G G T G G T C A A C G C C A A C G C A T C G C C C T C G C A C G G G C T T C C
 T G G C C G A T C C C A A A G T G T T G G T G C T T G A T G A T G C C A C C T C T G C C A T T G A T G C C T C C A C T G A G G A C C G C A T T T C C A G G C C T T G
 C G C G A A G A A C T G C A C G A T G T C A C C A T T T G A T C A T C G C G A C C G C C A C T C C A C T T G G A G G C T C G G C G A T C G G G T T G G T C T G G T
 C G G A A G A T G G A C G G G T A A C A G C A C T G G G A C C G T T G A G T G A G A T G C G T G A T C A C G C T C G T T C T C G C A T C T G A T G G C T C T T G A T T
 T C C A G G A T T C T C A C G A T C C C G G A A T T C A C C C T C G A C A A C G T T C A C T A C C C A G C C A A G A G C A A T T G T G G C C G G A G G G T C T C C A C A
 G A A A A G C A G T A C A A G A G T T C T T G G G C C T G C C C C T G G T C G A G G C C G T G G C A T G T C C A T G C C A G C A A C C C C T G A G C T G C T C G C C C A
 G A T T G A G G G C G T G C C A C G C A G C A A C G G A A G A A A C A C G A G T T G A T G C C G G G A G G C T A C G C A C C A G T A C C T C C G G T T C A A A T T G C
 T C A G T T T A T T C A A G C A G G T C C G T T G G C T C G T C G C G G T C A T C G C G T T G T G C T G G T G G G C G T A G C C G C C A T C T A G C A T T T
 C C A A C A C T G A T G C G C G A C G C A G C C A T C G A C A A C G G T G T G C A A G C A C A A A G C A C C T C C A C G T T G G T G G G A T C G C C A T C G C A G G C A G
 C G T A G T A G T C C T C T G C C T G G G C C G C C G C C G A T C A A C A C G A T T A T C A C G G C A C G C A C C G G T G A A C G G C T G C T T A C G G C T
 T G C G T C T G C G C T C A T T T G T G C A T C T A T T G C G C C T G T C C A T G A G C T A T T T G C A A C G C A C C A T G T C C G G C C G A T C A T G A C G C G C
 A T G A C C A C C G A C A T C G A C A A C C T C T C G T C C T C C A A T C A G G T C T G G C G A A A C A G T T G T C T C T G T G G G C A C G C T C A T C G G
 T G T G G T C A C C A T G C T C G C C A T C A C C G A C G C A C A A C T A G C A C T C G T T G C G C T G T C C G G C A T C A T C G T G C T C A C T C
 T C A T T T C C G A C G C A T C A G C T C C A G G C T G T A C A C C G C T T C A C G C G A G C A A G C C A G C C A G G T C A A C G C G G T A T T C C A C G A G T C C
 A T C G C C G G T T T A C G C A C C G C G C A G A T G C A C C G C A T G G A A G A C C A A G T C T T G A C A A T T A T G C G G G C G A A G C A G A G G A A T T C C G
 A C G C C T G C G T G T G A A A T C C C A G A C G G C C A T C G C C A T C T A C T T C C C C G G C T T G G C G C G C T C T G A A A T C G C C C A G G C A C T C G
 T C C T C G G T T T C G G C G C A C T G C A A G T A A C G C G C G G C G A C A T C T C C A C C G G C G T A C T C G T G G C A T T C G T G C T G T A C A T G G G C C T G
 A T G T T C G G C C C C A T C C A A C A A C T A A G C C A A A T C T C G A C T C C T A C C A A C A A G C C G C G T C G G C T T C C G T C G C A T C A C C G A A C T
 G C T C G C A A C G C A G C C C A G C G T C C A G A T C T G G G C A C C A A C A G G C A C G C T A G G C A G G C T G C C A C G C A G C C T T T A T T G C T T G A C G A
 C G T C A C C T T C G G C T A T T C A G A C G A T C C G A T C C

RXN02096 - 3'-Region

T A G A C A A C G T C A C C G T C C A G A T C

RXN00525 translatiert von RXN00525 (5915) von 1 bis 1263
 MSLAESILLALTSRSNKMALLTLLGVIIGIASVIGILTIGKALQDQTLNSLESLGANDLSAQVEERPDEDSPEPDMFAFSG
 AANSSGNLIPEETVDTLRDRFAGSITGISVGGMGTQGTLIGDTADLKSDLLGVNEDYMWMMNGVEMNYGRAITQDDVAAQRPV
 VIAPDTFNTLF DANPNLA LGSEVA FELNGQETFLRVIGVYKEAAAGGLVGSNPTVHTYTPYTVANDIHTEDGLNTLSIRAAQ
 GVDQDSLKGSLQTYFDALYANNDSHVAMLDFRKQIEEFTILGAMSLGISAIGGISLLVGGIVMNMILVSVTERTREIGVR
 KALGARRDIRLQFVVEAMIICFIGGILGVLLGGILGLIMSSAIGYISLPLSGIVIALVFSMAIGLFFGYYPANKAAKLDPI
 DALRYE

RXN00525 - 5'-Region

CCATCGTGTATTACTCACAACCCTGAGCTTGCTGATGAATCTGATCGGTGGTCACCATGGTTGACGGCGCATCATTGGG
 TCTGAGGTGAAACACTC

RXN00525 - kodierende Region

ATGAGCCCTTGAGAACATCAATTCTTGGCGCTCACCAGCCTGAGAACAGAACAGATGCGTCATTGGTGACGCTGTTAGGAGT
 CATCATTGGTATCGCATCAGTCATCGGAATTGACCATGGTAAAGCCCTGCAGGATCAAACCTTGAAATAGTTGAAAGCT
 TGGGCGGAATGATCTGTCGGCGCAGGTGGAGGAACGCCCGACGAAGATTCCCCGAAACCGATATGTTGCTTTCTGGG
 GCTGCAAACCTAGTGGCAATCTGATTCCGGAAAGAACAGTTGATACGCTGCGCAGTCAGCAGGAGCATCACGGAAAT
 CAGCGTTGGCGGAATGGGTACGCAAGGCACCTCATCGGCACACCCGAGATCTAAATCCGATCTCTCGGCGTCAACGAGG
 ATTATATGTGGATGAATGGCGTCGAAATGAACATACGGCCGCACATCAGCAAGACGATGTTGCCGCTCAGCGCCCCGTTGCG
 GTCATCGCCCCAGACACCTTAATACGCTTTCGACGAAACCCAACCTCGCTCTGGGTCCGAAGTAGCTTTGAACTCAA
 CGGTCAGAGAACATTTCGCGGGTTATCGGTGTGTATAAGAACGCGCAGCAGGTGGACTTGTGGAAAGCAATCCAACCGTCC
 ACACCTACACCCATATACGGTGGCCAATGACATCACCCACACGGAGATGGATTGAAACACGTTAACATCCGTCAGCTCAG
 GCGTAGACCAGGATTCACTTAAGGGTTCACTGCAAACCTACTTCGACCGCCTGTACGCCAACATGACTCGCACACGTTGC
 CATGTTGGACTTCCGTAAACAGATCGAAGAGTCAACACCCATTCTCGCGCAATGAGTTGGGTATCTCAGCCATCGGCGGAA
 TTTCCCTGTTGTCGGTGGCATCGGAGTGATGAACATTATGTTGGGTCTGTCACCGAGCGAACCCGAAATCGGTGTCGA
 AAAGCCCTCGGCCTCGTGACGTGACATTGCCCTGCAATTGTCGTTGAAGCCATGATCATTGTTCATCGGTGGCATTCT
 CGCGTGCTTTGGCGGCATTGGATTGATCATGTCAGCGCTATTGGCTACATTCCCTGCCACCACTGAGTGGAAATCG
 TGATCGCCTTGGTATTTCCATGGCTATCGGCCTGTTTCGGCTACTACCCCGCAACAAGGCAGCAAAGCTCGATCCAATT
 GACGCTTGCCTATGAG

RXN00525 - 3'-Region

AAAAAGCCTCGTTTAAGGTAG

RXN02515 translatiert von RXN02515 (4857) von 1 bis 756
 MSTLEIRNLHAQVLPSESAEPEILKGVNLTINSGEIHAIMGPNNSGKSTLAYTLGGHPRYEVTAEGVLLGENILEMEVDE
 RARAGLFLAMQYPTEIPGVSVANFLRSAATAIRGEAPKLREWVKEVRATAQEALADPEFSNRSVNEFGSGEKKRHEVLQLDL
 LKPKFAIMDETDSGLDVLDALRIVSEGINSYKQETEGGILMITHYKRILNYVKPDFIHVFANGQIVTTGAAELADKLEADGYDQ
 FIK

RXN02515 - 5'-Region
 GTGGCTAACGACAGTTACTGGCCAAGCTGGCGGAGAAAAACCGGCCAGCTAATACCTCAGTTAAAATCGCTTCAACC
 CTGAAAGATTGTGACAG

RXN02515 - kodierende Region
 ATGAGCACTCTTGAATCCGTAACCTGCACGCACAGGTCTGCCGTCCGATGAGTCCGCTGAGCCTAACGGAAATCCTCAAGGG
 CGTCAACCTCACCATCAACTCTGGTGGAGATCCACGCCATCATGGGCCCTAACGGTTCCGGCAAGTCCACTCTGCTTACACCC
 TTGGTGGACACCCACGCTACGAGGTAACCGCAGGGCAGGGCCTCTCGACGGCGAGAACATCCTGGAGATGGAAGTTGATGAG
 CGTGCACGCGCTGGTCTCTCCTGGCATGCAGTATCCAACCTGAAATCCCTGGCGTTCCGTTGCTAACCTCCTGCGTTCCGC
 AGCGACCGCAATCCGGGGAGGCTCTAACGCTCGCAGTGGGTTAACGGAAGTCCGCACCGCTCAGGAAGCTCTGGCAATTG
 ACCCTGAGTTCTCCAACCGCTCAGTCAACGAAGGTTCTCCGGTGGCGAGAACAGGCCACGAGGTTCTGCAGCTTGATCTG
 CTGAAGCAAAGTTCGCGATCATGGATGAGACCGACTCCGGCTTGACGTGGATGCACTGCGCATTGTTCCGAGGGCATCAA
 CTCCTACAAGCAGGAGACCGAACGGTGGCATCTGATGATCACCCACTACAAGCGCATCCTCAACTACGTTAACGCTGACTTCA
 TTCACGTTTCGCGAATGCCAGATTGTGACCACCGGTGGCGCTGAGCTGCTGACAAGCTCGAGGCTGACGGCTACGACCAG
 TTCAAG

RXN02515. - 3'-Region
 TAACATGTCCGATTTCTCAATG

RXN01946 translatiert von RXN01946 (7246) von 1 bis 1275

IRKYSRLEEQFQSLGGYEADAEEAQICDNLGLEARILDQQLKTLGGQRRVELAQILFAATNGSGKSKTTLLDEPTNH
LDADSITWLRLDFLAKHEGGLIMISHDVELLGAVCNKIWIYLDAVRSEADVYNMGFSKYVNDARALDEARRRERANAEEKKAG
ALKDQAARLGAKATKAAAQKMIARAERMDNLDEIRVADRAANIVFPEPAPCGKTPNAGLTKMYGSLEVFAGVDLAI
DKGSRVVVLGFNGAGKTLLKLLAGVERTDGEGGIVTGYGLKIGYFAQEHDТИDPDKSVWQNTIEACADADQQSLRSLLG
SFMFSGEQLDQPAGTLSGGEKTRLALATLVSSRANVLLDEPTNNLDPISEQVLDALRTYTGAVVLVTHDPGAVKALEP
ERVIVLPDGTEDLWNDQYMEIVELA

RXN01946 - kodierende Region

ATCCGCAAGTACTCCAGGCTCGAGGAACAATTCCAGTCGCTCGGCGCTACGAAGCTGACGCCGAAGCAGCCCAGATCTG
CGACAAACCTCGGCCTCGAGGCACGCATCCTCGACCAGCAGCTAAACCCCTGTCGGCGCCAGGCCGCCGCGTCGAGT
TGGCGCAGATCCTCTTCGCCGCCACCAACGGCTCCGGCAAATCAAAACACATTGCTTCTCGACGAGCCCACCAACCAC
TTGGACGCAGACTCGATCACCTGGCTCCGTGACTTCCTGGCGAAGCACGAAGGTGGACTGATCATGATTCGCACGACGT
CGAACTGCTGGCGCCGTATGTAACAAGATTGGTACCTCGACCGAGTACCGACGCAAGCCGATGTCTACAACATGGGCT
TTAGCAAATACGTCGATGCACGTGACTCGATGAAGCACGCCGACGCCGTGAGCGCGCAAACGCCAAAAGAAGGCCGA
GCCCTCAAGGACCAGGCTGCACGCCCTGGCGCAAAGCAACCAAGGCTGCCGAGCTAACGAGATGATGCCCGTGCAGA
ACGAATGATCGACAACCTCGACGAAATCCGCTAGCTGACCGCCGCCAACATCGTTTCCCAGAACCGACCCCTGTG
GAAAAACCCACTCAACGCCAAGGGCTGACCAAGATGTACGGCTCCCTCGAAGTCTCGCCGGCTCGACCTAGCCATC
GACAAAGGCTCCCGTAGTCGTCTCGGATTCACGGTGCAGGTAACCCCTGCTCAAACCTCTGCCGGTGTGGA
ACGCACCGACGGCAAGGGCAGTCGTCACGGATACGCCCTCAAATGGCTACTTCGCCAGGAACACGACACCATCG
ACCCCGACAAATCCGTCTGGCAAAACACCATCGAAGCCTGCCGACGCCGACCAACAAAGCCTCCGAGCCCTCGGA
TCCTCATGTTCTCCGGCAACAACTCGACCAACCAGCAGGAACACTCTCCGGCGGTGAAAAAAACCGCCTCGCACTGGC
CACCTCGTGTCTCCCGCGCAACGCTCTGCTCTCGACGAGCCACCAACACCTGACCGATCTCCCGCAACAGG
TCCTCGACGCACTCGCACCTACACCGCGCAGTCGTCTGGTTACCCACGACCCGGGTGCAGTCAAGGCCCTTGAGCCA
GAACGCGTCATCGTCTGCTTGTGATGGCACCGAGGATCTTGAATGATCAGTACATGGAAATCGTGAATTGGCG

RXN01946 - 3'-Region

TAGGTTCTAAGGCTTTATGCT

RXN01881 translatiert von RXN01881 (7932) von 1 bis 435

MANLINLENVSKTWGLKTLLDGVLGVSLVQTCGDRIGVVLNGGGKTTLEVLTGIEKPDQGRVSHNSDLRMAVVTQRAELNDDDT
VADVVLGPLGLEVFEASNATVRDVLLGIVDGLDTKVGKPFVGEAPTHQPGRRAGSRP

RXN01881 - 5'-Region

ACCGGCCCTGCGGCCTCAACCGCCGACCAGCGCGCGCACACATTTGACTGTTCTAAATAAAAGACAAACTTAAGTATCGGA
GTCGAAGAAAAACCACA

RXN01881 - kodierende Region

ATGGCCAATCTGATTAATCTCGAGAACGCTCTCAAAACCTGGGATTAACGCTTCTCGACGGTGTCTCCTTAGGTGTTCA
AACCGCGACCGCATTGGCGCTCGGCCTCAATGGTGGCGAAAACCCCTGCTGGAAGTACTACTGGCATCGAAAAGC
CGGATCAGGGCCGTGTCTCACAACTCTGACCTGCGATGGCTGGTGACGCAGCGTCTGAACCTCAATGATGACGACACC
GTCGCTGACGTGGCTGGACCTTGGGTTGGAAAGTTTCGAATGGGATCAAACGCCACGGTGCACGTCCTCGGTGG
CTTGGGCATTGTCGATCTGGCCTTGACACCAAGGTGGCAAACCTTTCCGGTGGCGAAGCGCCACGCACCAACCTGGCC
GCCGCGCTGGTTCGCGACCT

RXN01881 - 3'-Region

TGACCTGATCGTGCCTCGACGAGC

RXN01602 translatiert von RXN01602 (2220) von 1 bis 1530
 MAKTHIRLQDLSYTSPLITKLNITVSSGQCAVIVGENRGKTLRALAREFPPSAGEILTHGTVIAHQMHPAGDLSVG
 EICDEAIRDSKNALEELERAGALLETNTAHLGDYQQALDAAEVLDNAEHRLEKALRSFGAITDRSRALELSIGQRYRVR
 LACLIGGDADILLDEPTNHLDRGALNYLTEAITSHKGVLVSHDQALIKDVADEFIIDIDSTPDGLPRIYHEGFDSYRQRS
 ALLETWRQDYAAQTVQQQLQEDLEHARQRVNSSLKPPKGTKHTRASRAPGVQALKRAQDALDŠKALDVPPAPAPLLLPTL
 KVRPDKPMVDFSDLFVPHRLRLPGSHSVSGDKIVITGDNAGAKSTLIEVLSVLTPASGSVANHARTGVLGQESLVGEVPSI
 ARDAVKWGLLSVEESRFALQEFSIGQRRRLAMSLAGNPELLLDEPSNHLMSHLVSLTEWLDTTAAAVIMVTHDRQLLR
 DTAHWRHIELKS

RXN01602 - 5'-Region

TGCAGGCCACATGCCCTCCAGTGCCGTCTGCACGTTGATTTCCCTGCCACGACTGGTCGCAGGGCGACTTTCTAGCACT
 TTTAAAGGAATTTTTA

RXN01602 - kodierende Region

ATGGCTAAACCCATATCGGTTACAGGACCTTCCCTGTCATACACCTCAACCCGTTAATTACGAAGCTCAATATCACTGT
 TTCTCTGGACAGTGCAGTGATTGGTGGTGAGAATGGTGAGGTTAAACCAACTTCTGCAGGCAGTGGTCGAGAATTCC
 CGCCATCTGCAGGTGAGATTCTCACTCATGGCACGGTAGCAATTGCTCATCAACACATGCCCTGCAGGGTATCTGCGTCCGA
 GAGATCTGTGATGGCAATTCTGTGATTCAAAGAATGCTCTCGAAGAGCTTGAGAGAGCTGGAGCTACTTGAGACAAACAC
 TGCAGCAGCACTGATGGATATCAACAAGCCCTTGATGCCCTGAAGTGCTGACGCATGGAACGCTGAACATCGATTAGAA
 AAGCTCTGCCAGCTTGGCGCATACCGATAGATCCCGTCACTCAGTGAGCTATCGATGGGCAAAGGTATCGGTACGG
 CTGGCTGCCTCATCGGTGGATGCTGATATTTGCTTCGATGAAACCCACAAATCATCTTGACCGGCGCTTAACCA
 TCTCACCGAAGCCATAACCTCCCACAAAGGTGTTGACTGTTGTTCTCATGATCAAGCACTGATCAAAGATGTCGGGATT
 TCATCATCGATATTGATTCACACCCAGACGGCCTACACGGGATCTATCATGAGGGTTTGATTCTTATCGACGCCAAAGGAGT
 GCGCTCTTGAACACTGGAGGCAGGATTATGCCCTGCACAAACTGTGCAACAGCAATTGCAAGGAGGATCTAGAGCACGCACG
 CCAGCGGGTGAATTCTCGTGGAAACCTCCAAAAGGAACCGGAAAACACACTCGGCATCTGGGCTCCGGAGTGGTGCAGG
 CCTTAAAGCGAGCACAGGATGCGTTGGATAGCAAAGCGTGGACGTTGGACGTTCCCGCTCCGGCCATTGCTTCTGCCTACCTTG
 AAAGTGCACCAAGATAAACCATGGTGGACTTTCGGACCTTTGACCCACCGCTTGCCTGCCAGGCTCACATTCACT
 GGTATCAGGTGACAAAATAGTGCATCTGGTGACACGGCGCTGGCAAATCAACGCTCATGAAAGTCTGTCTGGGTTTG
 CTCCGCAAGTGGTGGTGCACAAACCATGCCGAACGGGTTCTGCCAAAGAATCACTTGCGGAGGTGCCATCAATA
 GCACGAGATCAGCAGTTAAGTGGGACTTTAAGTGGTGGAGGAGAGCCGATTGCCCTACAGGAATTCTCAATTGGTCAACG
 CAGAAGACTAGATTGGCATGCGTTAGCTGCCAATCCTGAACTGTTGCTTCGATGAAACCTTCAACCATCTGTCTATGC
 ACTTGTTCCGCACTTACAGAGTGGCTGGACACGACCGGGCTGCAGTGATCATGGTAACGCATGATCGACAGCTACTCCGC
 GATACGGCTCATGGAGGCACATCGAGTTGAAATCT

RXN01602 - 3'-Region

TAAGAATTGCAAGGGCTTCAC

RXN01212 translatiert von RXN01212 (3583) von 1 bis 924
 MPMTTTPAIDVTDLVRTYGDYTAVKGLNFHVQRGEVFGLLGTNGAGKTSTLEVIEGLSAPSSGTVRISGLDPVADRAILRPEL
 GIMLQSGGLPSQLTVAETMDMWHGTCTYPRAIKDVLADVLLHRENVKVGALSGGEQRLDLACALLGDPSILFLDEPTTGDL
 PESRRHTWQQLLQLKQRGVMMMLTTHYLEEAEFLCDRIAIMNAGEIAVEGTLDELVAREKSIISFVLRGQVELPVLSGAEII
 RDNNHVRIATTLQQHTLEILTWAETGIALEGFAAKPATLESVFMIDIASLENTSLQTA

RXN01212 - 5'-Region

TTTAGAACCCACATGACATATGTCATGAAAATTATGTGAAAGTCAGTAATACTCCTGACATATGGCTCTACCAGCGCCAAT
 GCGAAGTAGGAAGAATT

RXN01212 - kodierende Region

ATGCCTATGACAACGACACCAGCAATCGACGTAACAGACCTCGTGAGAACCTACGGCGACTACACCGCAGTCAGGGCCTGAA
 TTTCCATGTACAGCGCGGTGAAGTATTGGCTCGCTCGGACCAACGGGGCCGAAAACCTCCACCTTGGAAAGTCATCGAAG
 GACTTCCGCACCCAGCTCCGGCACCGTGCATCTCCGGCTTGAACCCGTTGCCGACCGCGATCCTGCAGCCCCGAGCTC
 GGCATCATGCTGCAATCAGCGGCCTGCCATCACAGCTCACCGTCCGAAACCATGGACATGTGGCACGGCACCTGCACGTA
 TCCGCGGCCATTAAAGATGTGCTTGCGACGTCGACCTCTACACCGCAAAACGTCAGGTGGCGCTTCCGGAGGCG
 AACAAACGACGCCCTGATTGGCCTGCCACTGCTGGGACCCCTCAATTGTTGCCGACGAAACCCACCAACGGCCTCGAC
 CCAGAAATCTAGGGGCCACACTGGCAACTCTGCTGGACCTGAAACAGCGCGCTCACCATGATGTCGACCAACCCACTACCT
 GGAGGAAGCCGAATTCCCTGCGACCCGGATTGCCATCATGAACGCCGAGATGCACTGGAAAGGCACCTTGGATGAACCTGG
 TGGCCCGCGAGAAGTCGATCATCAGTTGCTGCTGCGTGGGGCAGGTGGAGTTGCCGGTCTTGAGTGGGGCTGAAATCATC
 CGACACAACACACGTCCGATGCCACCACCCCTGAGCAGCACACCTTAGAAATACCTACCTGGCTGAGAACACCTCGC
 GATCGCGCTGGAAGGCTTCGCTGCAAAACCGCCACCTTGGAAATCCGTATTGAGAACATCGCCTCACTCGAGAACACCTCGC
 TGCAAACCGCC

RXN01212 - 3'-Region

TAGAAATCTTAAGGAGACCACAA

RXN01191 translatiert von RXN01191 (2562) von 1 bis 1590
 VGGVLVDKLLATPSMRDVVFALLIVAGGVVSSLGTVWGSALMARALEPAIAGLREDVLRAAVSLDANTIETAGRGDVISRIAD
 DSREVSTAASTVPLMVQAGFTVVIISAFGMAAVDWRLGLVGLVAIPLYWTTLRVLPNSGPLYTREREAFGVRTQRLVGA
 AETLRAFRAEDTELKRIDAASGEARDISISVFRFLTWAFSRNNRAECITLVLILGTGFYLVNIDLTVGAVSTAALIFHRLFG
 PIGTLVGMFSDIQSASASLIRMVGVINAASNQVSGTSPASASTALTLFDVSHHYHTAPVIKNASVQLEPGEHIAIVGATGAGK
 STLALIAAGLLSPTSGQVALGGSSFSNVEPEALRQKIAMVSQEIHCFRGSVLDNLRIARPEATDADIAVLA
 DIGDSWLERLP
 QGIDTIVGDGAFRLTSVENQIMALARVHLADLAIVILDEATAESGSDHAKQLEDAALKVTENRSAAIVAHRLNQAKTADRIIV
 MDSGEIIESGTHEELRAIGGRYEQLWTAWSAR

RXN01191 - 5'-Region

CGCTGCTTCACGCACTGAAACCGCACCGGATCAAGTTATTGGGGTTGTTCTTGTGGCGTGTGGTGGCCGTCGCCGGGT
 TGGTAGGGCCCTGGCG

RXN01191 - kodierende Region

GTGGGTGGACTCGTCGATAAGCTCCTTGCACCCCCGAGCATGCGCAGCTGTAGTGTTCGCGCTGCTTATCGTGGCTGGCG
 CGTTGTTTCGAGCCTGGGACGTGGGGCAGCGCGCTGATGGCGCGCGTTGGAGCCGGCAGTCGCGGGCTGCGCAGG
 ATGTGTTGCGCGCGGGTGTGAGTTGGATGCGAACACGATTGAAACGGCGGGCGCGCAGTGATTCGCGTATCGCGAT
 GATTCCGGGGAGGTGTCCACTGCGGCAGCACCGTGGTCCGCTGATGGTGAGGCGGGCTTACCGTGGTGTATTCCGCGTT
 TGGCATGGCGCGGTTGATTGGCGCTCGGCCTGTCGGTTGGTCCGATCCCCTGTATTGGACACGTTGCGCGTCTATT
 TACCCCGCTCAGGTCCGCTTATACCGGTGAGCGCGAGGCCCTTGGGTGCGCACGCGAGGGCTTGTGCGCAGTCGAAGGC
 CGGAAACCTGGCGCTTCCCGCAGAAGATACAGAAATTAAAGCGTATCGACGCAGCCTCCGGCGAAGCCCGCACATT
 CATTCTGTTTCAGGTTCTCACATGGGATTTCCCGCAACAACCGCGGAATGCATCACCCCTGCTCATCTGGCA
 CCGGCTTTACCTGGTCAACATCGATCTGGTCAACCGTCCGCGAGTCCTCAACCCCGCACTGATCTCCACCGACTCTCGGT
 CCAATCGGCACGCTCGTGGGATGTTCTCCGACATCCAATCCGCGAGCGATCGCTGATCCGATGGTGGCGTTATTACGC
 GGCATCGAACCGAGTCAGCGCACCTCCGGCGTCTGCCAGCACCGTTAACGCTTTGACGTCCTCCACCACTATCACA
 CTGCACCCGTATCAAGAATGCATCCGTGCAAGCTGGAACCGGGAACACATCGCATTGGTCCGACCGGCTGGTAAA
 AGCACCGCTGCCCTCATTGGCGCAGGCCTGCTCAGCCAACTCCGGCAGGTGGCTCTGGCGATCGAGTTTCTAACGT
 CGAACCGGAAGCATTGGCCAGAAGATCGCGATGGTCAGCCAAAGAAATCCACTGCTCCGAGGATCTGTTTAGATAATCTC
 GTATCGCACGCCCGAACCGATGCCGACATCCACGCCGTTCTGCCGATAATTGGTATTCTGGTGGAGCGCTTACCG
 CAAGGCATAGACACCCTGTTGGGTGATGGCGCTTCCGTTAACCTCTGTGGAAAACAGATCATGGCGCTTGCGTAC
 TTTGGCGACCTAGCAATCGTACCTTGATGAAGCAACGGCTGAATCAGGCTCTGATCATGCAAAACAGCTGAAGATGCAG
 CCCTTAAAGTCACTGAAACAGATCAGCCATCATCGTGGCTCACCGCCTCAACCAAGCGAAAACGCCGATCGCATCATCGTC
 ATGGACTCCGGAGAAATCATAGAAATCTGGAACCCATGAAGAGCTTCGAGCGATGGCGGCGATATGAACA
 ACTGTGGACTGC

RXN01191 - 3'-Region

TAATTAGCCACCCAAGACCGACGC

RXN00733 translatiert von RXN00733 (1945) von 1 bis 885
MSNTAGPRGRSHQADAAPNQKAQNFGPSAKRLFILGHDRNLTIFVIFLAVLSVGLPWLKGATNVVFEGFLSKRMPAG
ASKEDIIAQLQAAGKHNQASMMEDMNLVPGSGIDFEKLAMILGLVIGAYLIGSLLSLFQARMLNRIQSQSAMHRLRMEVEEKIH
RLPLSYFDSIKRGDLLSRTNDVDNIGQSLQQTLSQAITSLLTVIGVLVMMFIISPLLALVALVSIPTIVVTVVVASRSQKL
FAEQWKQTGILNARLEETYSGHAVVKVFGHQKDVQEAFEEENQACV

RXN00733 - 5'-Region
ACGGCGAGGTTGTCGGTATTGGAACGCACACGAATTGCTAACACGTGCGGTACCTACCGTAAATTGTTGAATCCAAGAG
ACTGCGCAGGCCAATC

RXN00733 - kodierende Region
ATGAGTAATACTGCAGGCCCGCGGGCTTCCCATCAGGCAGACGCCGCCGAATCAAAGGCACAGAAATTCCGGACCATC
TGCCAAAAGGCTTTCGGAATTCTAGGCCATGACCGTAACACCTAATTTTGTATCTCCTAGCCGCTCTGAGCGTTGGAC
TTACCGTCTTGGGCCATGGTGTGGTAAAGCCACCAACGTGGTGTGAAGGATTCTATCTAAGCGCATGCCGGCTGGT
GCGTCAAAGGAAGATATCATCGCGCAGTGTGAGGCTGCAGGTAACATAATCAGGCTTCCATGATGGAAGACATGAACCTGT
TCCAGGCTCAGGCATTGATTTGAAAAATTAGGCATGATCCTCGGACTGGTGATCGGTGTTATCTCATCGGTAGCCTGTTGT
CGTTGTTCCAGGCCGGATGCTCAACCGCATCGTCAAAGTGCCATGCCACCGCTGCCATGGAGGTGGAGGAAAAATCCAC
CGCCTACCGCTGAGCTATTCGATTCATCAAACGTGGTGTGATCTGCTTAGCCGTGTGACCAACGATGTGGATAATATCGTCA
ATCCCTGCAACAAACCTTGTACAGGCATCACTCCCTACTGACCGTCATCGGTGTTGGTGATGTTATCATCTCCC
CACTGCTCGCACTCGTGGCGCTGGTATCCATTCCGGTCACCATCGTGGTCACTGTGGTGGTGCAGCCGTTCCAGAAACTC
TTTGGGAACAGTGGAAAGCAGACCGGTATTTGAATGCGCGCTGGAGGAAACCTACTCTGGCCACGCCGTGGTTAAGGTTT
CGGACACCAAAAGGATGTTCAAGAACGATTGAGGAAGAAAATCAAGCTTGTGTA

RXN00733 - 3'-Region
TAAGGCCAGCTTGGTGCCAGT

RXN00164 translatiert von RXN00164 (2228) von 1 bis 1689
VGRIPRAKWWFLGALVLLSAGAYASVLPQVLGRIVDLVSDGAQMRFVLSVILIAVIAIAGAVLSACGFYVVSRISEKIIAN
LREDMVGTALGLPTHQVEDAGSGDLVSRSTDDVSELSAAVTETVPILSSSLFTIAATIIALFSLDWQFVLIPVVAAPVYYFAS
KHYLSKAPDRYAAERAAMAERARKVLEAIRGRATVRAYSMEDAMHNQIDQASWSVVKGIRARTTMLILNMWMLFAEFLMLAV
ALVIGYKLVIDNALTIGAVTGAFLMIIRLRGPMNMFMRLDTIQSGYASLARIVGVVADPPIPVPDSGVAPQGKVELRNVSF
SYGDSWAVKDIDITINSGETVALVGASGAGKTTVAALLAGLRVPDQGVLVDDFPVSHLSRERIARLAMVSQEVTGVFSGTLR
QDLTLAKPDASDEELAHLGQVNALDWLESPEGLDTVVGARGIQLEPVVAQQLALARVLLNPAIVIMDEATAEAGSAGASA
LEEAADAVSKNRSALVVAHRLDQASRADQILVMDKGEVVESGTHQELLDHGGIYQRLTAWSGR

RXN00164 - 5'-Region

CTGCTTGCAGGGAGGTTATGAAATGAGTGGGGAGACGTCGAAAAGCATGCGCTTCCGTTGGCCAGCCTGCCAAGTGCAGC
GCGAGGTGGCCCGGCAG

RXN00164 - kodierende Region

GTGGGTCGTATTCCCGCGGGCGAAGTGGTGGTTTTAGGCGCGCTGGTGGTCTGAGTGCAGGCGCTTATGCGTCGGTGTGGT
GCCGCAGGTGCTGGGGCGGATTGTGGATCTGGTGTCCGATGGCGCGCAGATGCGTATTGTTGAGCTCAGTGTGATTCTCA
TTGCGGTGGCAATTGCCGGCGCGTGTCTAGTGCCTGCGGGTTCTATGTGGTGTGCGGATTCTGAGAAGATTATGCCAAT
TTGAGGGAAAGATATGGTGGCACCGCGCTTGGGGTGCCTACCGCACCAGGTGGAAAGATGCCGCTCTGGCATTGGTGGAGCCG
CTCCACCGATGATGTCTCGAGCTATCCGAGCGTACAGAGACCGTCCGATTAACTGTTCTCACTGTTACCATGGCG
GACGATCATTGCGCTGTTCTTGACTGGCAATTGTGCTCATTCCTGCTGGTGGCCGGTGTACTACTTCGCGTCC
AGCACTATTGAGCAAGGCCGGATCGGTATGCGCAGAACGCGCGCGATGGCGAGCGTGGCAGCGAAAGGTACTTGAGGC
TATTGCGGGCGTGCAACTGTGCGGGCTATTCCATGGAAAGATGCCATGCATAATCAGATTGATCAGCGTCGTGGTGTGG
TGGTCAAGGGTATTGTCGCGCACCACCATGTTGATTTGAAACATGTTGATGCTGTTGCCGAAATTCTCATGCTCGCGTC
GCGTTGGTGTACGGCTACAAGCTGGTCTTGATAATGCGCTGACGATGGCGCCGGTACCGGTGCCGTGCTGATGATTATCG
TCTGCGTGGCCCGATGAAATATGTTCATGCGCTGCTCGACACCATTCAATCCGGCTATGCCGCTGGCGCGATCGTGGAG
TTGTTGCGGATCCCGCATCCTGTGCCGACAGCGGTGTGAAAGCACCTCAGGGCAAAGTGGAAATTGCGCAACGTCAGCTT
AGCTATGGCGATCCTGGCGGTGAAAGACATCGACATCAGATCAATTCCGGCAAAGTGTGCGCTCGTGGCGCATCTGG
CGCAGGTAAGACGACGGTCGCCCTGCTGGGGCTGCGGGTCCAGATCAAGGGCAAGTGTGCGACGACTCCCCG
TCTCTCACCTCTGACCCGAGCGTATGCCCGTTGGCATGGTCAGCCAGGAGGTTCATGTTCTCCGGCACGCTGCC
CAGGATCTCACCTGGCTAAACCAGATGCCCTGGATGAGGAATTAGCGCATGCTCTGGGCAAAGTTAATGCCCTGACTGTT
GGAGAGTCTTCCAGAAGGACTGGACACGGTCGTTGGTGCAGGAATCCAGCTAGAACCAAGTGGTGGCTCAGCAGTTGGCGT
TGGCCCGGGTGTGCTCAATCCGGCATCGTCATGGATGAAGCCACGGCAGAAGCAGGATGCCGGTGGCATAGGCATCGCGGCTGA
CTGGAAGAGGCTGCAAGTGCAGTGAGCAAGAACGTTCCGCATTGGTGGTGGCCACCGGGTGGATCAGGCATCGCGGCTGA
TCAGATTCTGGTGTGATGGATAAGGGGGAGGTTGGAATCCGGTACTCACCAGGAGTTATTGGATCACGGGGTATTATCAGC
GTCTGTGGACTGCGTGGAGTGTGCGGAAGA

RXN00164 - 3'-Region

TAGTTGACTGTTCAATGCGTTGA

CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM-GENE, DIE PROTEINE CODIEREN, DIE AN DER MEMBRANSYNTHESE UND AM MEMBRANTRANSPORT BETEILIGT SIND.

5 Zusammenfassung der Offenbarung

Isolierte Nukleinsäuremoleküle, die als MCT-Nukleinsäuremoleküle bezeichnet werden und neue MCT-Proteine aus *Corynebacterium glutamicum* codieren, werden beschrieben. Die Erfindung stellt 10 zudem Antisense-Nukleinsäuremoleküle, rekombinante Expressionsvektoren, die MCT-Nukleinsäuremoleküle enthalten und Wirtszellen, in die die Expressionsvektoren eingebracht worden sind, bereit. Sie stellt weiterhin isolierte MCT-Proteine, mutierte MCT-Proteine, Fusionsproteine, antigene Peptide und Verfahren zur 15 Verbesserung der Produktion einer gewünschten Verbindung aus *C. glutamicum* bereit, die auf der genetischen Manipulation von MCT-Genen in diesem Organismus beruhen.

20

25

30

35

40

45

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.